

**EXPERIMENTELLE PANKREAS - UND
INSELTRANSPLANTATION IM
RATTENMODELL**

ALEXANDER DIBELIUS

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0011

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel

EXPERIMENTELLE PANKREAS- UND INSELTRANSPLANTATION
IM RATTENMODELL

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alexander Dibelius
aus München

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. B. U. v. Specht
Prof. Dr. H. Frick

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel
Prof. Dr. H. Mehnert

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.03.1987

Meinem Patenonkel
Karl Anton Lutsch
zum

75. Geburtstag

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>Seite</u>
EINFÜHRUNG	1
<u>THEORETISCHER TEIL</u>	4
1. GRUNDLAGEN	4
1.1 Diabetesdefinition	4
1.2 Diabetesformen	5
1.2.1 Typ I Diabetes	6
1.2.2 Typ II Diabetes	10
1.2.3 Sekundäre Diabetesformen	11
1.2.4 Endokrine Diabetesformen	12
2. BEHANDLUNGSMÖGLICHKEITEN EINES DIABETES	14
2.1 Insulin	16
2.2 Transplantation	16
2.3 Immunsuppression	18
3. PROBLEMATIK DER INSELTRANSPLANTATION ALS THERAPIE	20
3.1 Inselisolation	20
3.2 Inseltransplantation	25
3.2.1 Transplantationsite	26
3.2.2 Verunreinigung der Präparation	28
3.2.3 Transplantatabstoßung	30
3.3 Klinische Versuche	35
4. PROBLEMATIK DER PANKREASTRANSPLANTATION ALS THERAPIE	37

	<u>Seite</u>
4.1 Operationstechnische Probleme	38
4.2 Transplantatabstoßung	40
4.3 Klinische Ergebnisse	41
5. ZUSAMMENFASSUNG	45
 <u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	 46
1. EIGENE FRAGESTELLUNG	46
2. MATERIAL UND METHODEN	48
2.1 Allgemeine Methoden	48
2.1.1 Tiere	48
2.1.2 Diabetesmodell	49
2.1.3 Glukosebestimmung	49
2.1.4 Narkose	50
2.1.5 Blutentnahme	50
2.1.6 Insulinbestimmung	51
2.1.7 Intravenöser Glukosetoleranztest	51
2.1.8 Immunsuppression	52
2.1.9 Cyclosporin A-Spiegelbestimmung	53
2.2 Spezielle Methoden für die Insel- transplantation	 53
2.2.1 Inselisolation	53
2.2.2 In vitro Glukosestimulationstest	63
2.2.3 In vitro Glukoseperifusionstest	64
2.2.4 Inseltransplantation	64
2.2.5 Postoperative Verlaufskontrolle nach Inseltransplantation	 66
2.2.6 Gemischte Lymphozytenkultur	66

	<u>Seite</u>
2.2.7 Histologische Untersuchungen an insel- transplantierten Tieren	67
2.3 Spezielle Methoden für die Pankreas- transplantation	68
2.3.1 Spenderoperation	69
2.3.2 Empfängeroperation	71
2.3.3 Postoperative Verlaufskontrolle nach Pankreastransplantation	74
2.3.4 Amylasebestimmung	74
2.3.5 Histologische Untersuchungen an pankreas- transplantierten Tieren	75
2.4 Statistik	75
3. ERGEBNISSE	77
3.1 Inselisolation	77
3.1.1 In vitro Glukosestimulationstest	81
3.1.2 In vitro Glukoseperifusionstest	82
3.2 Inseltransplantation	83
3.2.1 Überlebenszeiten	87
3.2.2 Cyclosporin A-Spiegel	90
3.2.3 Intravenöse Glukosetoleranzteste	91
3.2.4 Gemischte Lymphozytenkultur	93
3.2.5 Histologische Untersuchungen	93
3.3 Pankreastransplantation	101
3.3.1 Operationstechnische Erfahrungen	101
3.3.2 Überlebenszeiten	104
3.3.3 Intravenöse Glukosetoleranzteste	109
3.3.4 Amylasebestimmungen	110
3.3.5 Histologische Untersuchungen	110

	<u>Seite</u>
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	114
4. DISKUSSION	115
4.1 Diskussion der Methoden	115
4.2 Diskussion der Ergebnisse	118
LITERATURVERZEICHNIS	123
ANHANG	152

EINFÜHRUNG

Der Diabetes mellitus ist eine durch einen erhöhten Glukosegehalt im Blut charakterisierte Regulationsstörung des Stoffwechsels. Im Vordergrund steht dabei der Mangel an endogenem Insulin.

Das Krankheitsbild ist sehr komplex und umfaßt Störungen verschiedenster metabolischer Regelkreise. Abbildung 1 faßt einige Symptome zusammen, ohne jedoch näher auf deren Ursachen einzugehen.

Zeichen eines Diabetes mellitus :Generell :

Hyperglykämie
Müdigkeit
Durst
Polyurie
Glukosurie
Polydipsie
Gewichtsabnahme
Polyphagie
Infektanfälligkeit
Sehstörungen
Adynamie
Muskelkrämpfe
Übelkeit
Erbrechen
Juckreiz

Im akuten diabetischen Syndrom

Ketonämie
Ketonurie
metabolische Azidose
Hyperventilation
Bewusstlosigkeit
Hypertriglyzeridämie
Steatosis hepatica
Xanthomatosis diabetica
Aminoazidämie
transitorische Refraktionsanomalien

Die hohe Morbidität - ca. 2 bis 3 % der Bevölkerung in Industrienationen leiden an einem Diabetes mellitus (117) - läßt die Krankheit auch unter sozio-ökonomischen Gesichtspunkten als bedeutend erscheinen.

Für die betroffenen Patienten selbst sind allerdings andere Daten wesentlich wichtiger und zugleich erschreckender: Nach 15 Jahren Krankheitsverlauf sind ca. 50 % der Diabetiker von schweren Spätfolgen ihrer Krankheit betroffen. So sind z.B. 12 % aller Fälle von Erblindung durch einen Diabetes mellitus verursacht.

Auch die Lebenserwartung eines Diabetikers ist heute noch vermindert. Die Literatur gibt Werte zwischen 25 bis 30 % Verminderung der durchschnittlichen Lebenserwartung an (38). Dafür dürfte vor allem das erhöhte Risiko der coronaren Herzkrankheit verantwortlich sein.

Diabetische Männer tragen gegenüber der Normalbevölkerung ein um ca. 50 % höheres Risiko, für diabetische Frauen erhöht sich das Risiko sogar um 150 % gegenüber der Normalbevölkerung.

Diese Zahlen sprechen eine deutliche Sprache und lassen es verständlich erscheinen, warum diese Krankheit Gegenstand intensiver Forschung ist. Seit der Entdeckung von Insulin durch Banting und Best im Jahre 1921 und der Einführung in die klinische Therapie, ist der sichere frühzeitige Tod eines Diabetikers im hyperglykämischen Koma zunächst abwendbar geworden. Das chronische diabetische Spätsyndrom ist durch diese Therapie jedoch nicht oder nur sehr beschränkt beeinflussbar.

Deshalb konzentrieren sich weitere Forschungsarbeiten auf den Ersatz der verlorengegangenen bzw. zerstörten B-Zell-

masse. Leider sind diese Arbeiten, abgesehen von der klinisch bereits durchführbaren Pankreastransplantation weitgehendst im tierexperimentellen Stadium.

THEORETISCHER TEIL

1. GRUNDLAGEN

1.1 Diabetesdefinition

Die WHO (1964) gibt als Diagnosekriterium für einen manifesten Diabetes mellitus - neben dem Vorhandensein der klassischen klinischen Symptome, so z.B.: Polydipsie, Polyurie, Gewichtsverlust oder auch Ketonurie entweder in Kombination oder auch einzeln - folgende Richtlinien an:

- Die Nüchternglukosewerte im Plasma von Venenblut sollten bei zwei Kontrollen über 140 mg/dl bzw. 6,7 mM liegen. Nüchtern bedeutet hierbei 10 bis 16 h Nahrungskarenz. Ferner sollten sonstige Einflüsse auf den Blutglukosespiegel, wie andere Stoffwechselstörungen oder medikamentöse Beeinflussung, ausgeschlossen sein.
- Der orale Glukosebelastungstest mit 75 g Glukose sollte einen Zweistundenwert von über 200 mg/dl oder 10,0 mM ergeben.

Abbildung 2 faßt diese Kriterien nochmals zusammen.

Nüchternglukosewerte unter 115 mg/dl oder auch 6,4 mM gelten bei Erwachsenen als eindeutig normal. Andererseits weiß man aus epidemiologischen Untersuchungen, daß Patienten mit einem Zweistundenwert im oralen Glukosetoleranztest von über 200 mg/dl (10,0 mM) nur zum Teil eine Progreienz zum manifesten Diabetes mellitus zeigen, sofern keine anderen Kriterien zur Diagnose eines Diabetes vorliegen. Deshalb hat die National Diabetes Data Group (117) den Begriff der "impaired glucose tolerance" (pathologische Glukose-Toleranz) eingeführt.

Kriterien für die Diagnose eines Diabetes mellitus (WHO):

Nüchternblutglucose in zwei Kontrollen

> 140mg/dl oder 6,7mM

oder

Blutglucose nach oraler Glucosebelastung nach 30, 60 und/oder 90 min.

> 200mg/dl oder 10,0mM

oder

erhöhte Blutglucose und zusätzlich Vorliegen der klassischen klinischen Symptome (Polydipsie, Polyurie, rapider Gewichtsverlust, Ketonurie)

Abb. 2

1.2 Diabetesformen

Durch die bisher angeführten Kriterien bleibt vollkommen unberücksichtigt, welche Diabetesform vorliegt. Einerseits könnte man versuchen, den Diabetes nach seiner zeitlichen und klinischen Verlaufsform in einen manifesten, latenten, subklinischen, stabilen, Mody-, oder Brittle-, Diabetes einzuteilen.

Hier bleibt die Genese des Diabetes nahezu unberücksichtigt. Andererseits erscheint die Einteilung des Diabetes

unter Berücksichtigung pathogenetischer Faktoren sinnvoll. An dieser Einteilung könnten sich die Behandlungsmöglichkeiten orientieren.

1.2.1 Typ I Diabetes

Der Typ I Diabetes oder auch "juvener Diabetes" wird gemeinsam mit dem Typ II Diabetes oder auch "Altersdiabetes" als ideopathischer Diabetes bezeichnet. Beide machen den Hauptanteil aller Diabetesformen aus.

Die Bezeichnung IDDM (insulin dependent diabetes mellitus) wird oftmals mit dem Typ I Diabetes synonym gesetzt, obwohl beide Bezeichnungen von einer anderen Einteilung der Diabetesformen ausgehen.

"Juvener" Diabetes bedeutet, daß die Erkrankung oftmals bereits zwischen dem 6. und 25. Lebensjahr auftritt. Jedoch ist auch das Neuauftreten eines typischen Typ I Diabetes nach dem 40. Lebensjahr beschrieben (38).

Das Einsetzen der Stoffwechselstörung erfolgt oftmals sehr abrupt. Dies wird durch die Tatsache verdeutlicht, daß ein Typ I Diabetes vielfach erst bei Vorliegen eines ketoazidotischen Komas diagnostiziert wird. Die Typ I Diabetiker sind meist für den Rest ihres Lebens von exogener Insulinzufuhr abhängig. Die Pathogenese des Typ I Diabetes ist letztlich nicht vollständig geklärt, allerdings finden sich Anhaltspunkte für das Zusammenwirken von drei für die Manifestation des Diabetes wichtigen Faktoren:

1. Bestimmte mit dem HLA-System gekoppelte genetische Konstellationen disponieren zu einem Diabetes. Epidemio-

logische Untersuchungen an Menschen zeigten, daß der Typ I Diabetes oftmals mit den HLA DR 3 Antigen und dem HLA DR 4 Antigen positiv bzw. mit dem HLA DR 2 Antigen negativ assoziiert ist.

Etwa 90 % der Typ I Diabetiker sollen DR 3 / DR 4 positiv sein. Noch nicht völlig geklärt ist, inwieweit diese Konstellationen alleine für die Entwicklung eines Diabetes verantwortlich sein können, oder inwieweit sie nicht nur eine verstärkte Empfindlichkeit für andere pathogenetisch wichtige Faktoren bedingen. Einiges spricht dafür, daß die HLA DR 3 Konstellation zur allgemeinen endokrinen Autoimmunopathie, die HLA DR 4 Konstellation zu einer erhöhten Virusempfindlichkeit disponiert (63).

Diesbezüglich konnte im Tiermodell nachgewiesen werden, daß die Empfindlichkeit für einen diabetes-induzierenden Virus bei der Maus (EMC-Virus) vom HLA-Typus abhängig ist (31).

2. Eine virale Beteiligung bei der Entstehung des Diabetes konnte beim Menschen bisher noch nicht endgültig schlüssig bewiesen werden. Doch gibt es vielerlei Hinweise für eine Virusbeteiligung, so wird zum Beispiel dem Coxsackie-B-Virus eine Rolle bei der Diabetes-entstehung zugeschrieben (175, 72). Im Tiermodell sind diabetogene Viren bereits nachgewiesen (30, 18, 134).

Wie bereits erwähnt, hängt die Manifestation des Diabetes jedoch zusätzlich von der genetischen Konstellation ab. Viren wird also mehr eine Cofaktorenfunktion bei der Pathogenese des Diabetes mellitus zugeschrieben.

3. Auch Autoimmunphänomene und damit das körpereigene Abwehrsystem sind bei der Entstehung eines Typ I Diabe-

tes beteiligt. Verschiedene Forschungsgruppen konnten sowohl beim Menschen, als auch in Tiermodellen Antikörper gegen Inselzellen nachweisen. Dabei reagierten die aus dem menschlichen Blut gewonnenen Antikörper mit menschlichen (108) und tierischen (104) Inseln.

Als Antigene sind sowohl Oberflächenstrukturen der Inseln, als auch Bestandteile des Cytoplasmas beschrieben (17). Weitere in vitro Versuche zeigten, daß diese Antikörper komplementabhängig gegen Inselzellen cytotoxisch reagieren (105, 133).

Speziell gegen B-Zellen findet diese cytotoxische Reaktion in noch stärkerem Maße statt (34). Um die Rolle dieser Antikörper richtig beurteilen zu können, muß jedoch berücksichtigt werden, daß sich auch bei manchen Patienten, die niemals an einem Diabetes erkranken, Inselzellantikörper nachweisen lassen. Dies geschieht oftmals als Begleitreaktion im Rahmen von Infektionen bakterieller und viraler Art (62, 76).

Im Serum von Typ I Diabetikern lassen sich antinukleäre Antikörper (64) und zirkulierende Immunkomplexe (38) nachweisen. Diese sind gegenüber Normalpersonen oder auch gegenüber Typ II Diabetikern mit höherer Inzidenz anzutreffen.

Die vorwiegend das humorale Immunsystem betreffenden Befunde werden ergänzt durch festgestellte Besonderheiten des zellulären Schenkels der Immunregulation. Dies weist auf eine zusätzlich bestehende zelluläre Autoimmunität beim Diabetiker hin.

Ausgangspunkt für diese Untersuchungen waren morpholo-

gische Befunde am Pankreas verstorbener juveniler Diabetiker. Bereits 1902 konnte erstmals eine selektive lymphozytäre Infiltration um die Langerhans'schen Inseln demonstriert werden (142, 111). Später wurden die typischen morphologischen Veränderungen sehr anschaulich beschrieben (49, 46). Dennoch konnte bislang nicht endgültig bewiesen werden, daß die sogenannte "Insulitis" Ursache für die diabetische Stoffwechselstörung ist. Ebenso wäre denkbar, daß die beobachtete Infiltration eine Folge der Zerstörung der B-Zellen in der Insel ist.

Weitergehende Arbeiten beschreiben auch funktionelle Veränderungen im Bereich des zellulären Immunsystems. Diese Ergebnisse werden jedoch kontrovers diskutiert und sind nicht in allen Fällen reproduzierbar. Es ist über eine Verschiebung der T-Zellpopulationen mit einer Verminderung der Suppressorzellen (28, 8) und auch über eine Vermehrung der cytotoxischen T-Zellen (128) berichtet worden.

Andere Autoren beschreiben eine generelle Verminderung der T-Lymphozyten bei juvenilen Diabetikern im Gegensatz zu Typ II oder auch Altersdiabetikern (29). Die Killerzell-Aktivität bei Diabetikern scheint erhöht (129) und auch die Ia-Antigen tragenden Lymphozyten nehmen als Zeichen einer Aktivierung des Immunsystems zu (71). Lymphozyten von Diabetikern haben selbst einen hemmenden Effekt auf die Insulinsekretion aus B-Zellen (14).

Alle hier in Kürze aufgeführten Beobachtungen und Daten lassen sich zu einer Hypothese der Entstehung des Typ I Diabetes zusammenfassen, die jedoch weit davon entfernt ist,

ein vollständiges Bild der Pathogenese zu liefern:

Die genetische Empfänglichkeit für einen Typ I Diabetes wird durch zwei Gene des Chromosoms 6 determiniert. Sie agieren durch verschiedenartige Mechanismen und sind mit dem HLA-DR 3 bzw. dem HLA-DR 4 Antigen assoziiert. Die Reaktion empfänglicher Patienten auf bestimmte exogene Faktoren (Virus oder ähnliches) ist verschieden, führt aber letztlich zur Destruktion von B-Zellen, wahrscheinlich auf dem Wege einer Regulationsstörung des Immunsystems (116).

1.2.2 Typ II Diabetes

Beim Typ II Diabetes liegt eine sich über viele Jahr hinweg entwickelnde Insulinsekretionsstörung vor. Die Insulinsekretion gegenüber adipösen Normalpersonen ist beim Typ II Diabetiker vermindert, gegenüber normalgewichtigen Personen jedoch gleich oder sogar erhöht. Es besteht also eine relative Insulindefizienz, die oft auch mit einer peripheren Insulinresistenz einhergeht.

Der Typ II Diabetiker läßt sich relativ gut mit diätetischen Maßnahmen oder oralen Antidiabetika behandeln, so daß in der Regel keine Insulinpflichtigkeit besteht. Der Diabetes manifestiert sich zumeist nach dem 40. Lebensjahr und ist durch eine relativ stabile Stoffwechsellage charakterisiert.

Genetische Faktoren spielen auch bei der Genese des Typ II Diabetes eine Rolle. So erhöht sich das Risiko von Kindern, deren Eltern beide Diabetiker sind, an einem Typ II Diabetes zu erkranken, um den Faktor 3. Erkrankt bei eineiigen Zwillingen einer der beiden an einem Typ II Diabetes, so erkrankt in 87 % der Fälle auch der zweite Zwilling.

Für den Typ I Diabetes läßt sich jedoch nur eine Konkordanz von 55 % nachweisen (38). Im Gegensatz zum Typ I Diabetes ist keine Assoziation mit bestimmten HLA-Antigenen feststellbar. Die histologischen Befunde von Pankreata ergeben beim Typ II Diabetes kein einheitliches Bild.

Die beobachtbare Reduktion der B-Zellmasse ist moderat und kann auch bei älteren normoglykämischen Personen gefunden werden (49). Einzig ist eine gehäufte Inselfibrose bzw. Inselhyalinose nachweisbar.

Als den Typ II Diabetes auslösende Faktoren gelten vor allem Umwelteinflüsse, wie z.B. ein Überangebot an Kalorien und eine damit verbunden Fettleibigkeit. Das daraus resultierende Übergewicht ist jedoch keinesfalls immer vorhanden. Das Gewicht bildet vielmehr die Grundlage für eine weitere Subklassifizierung des Typ II Diabetes in eine Gruppe IIa mit normalem Körpergewicht und eine Gruppe IIb mit Übergewicht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Typ II Diabetes in seiner Ätiologie ebenso unklar ist wie der Typ I Diabetes, jedoch seine Prognose schon allein aufgrund des hohen Manifestationsalters und der relativ milden Hyperglykämie bei weitem besser ist. Die meisten Typ II Diabetiker sind von den Folgen ihrer Krankheit im Sinne eines chronischen diabetischen Spätsyndroms kaum betroffen.

1.2.3 Sekundäre Diabetesformen

Die unter diesem Oberbegriff zusammengefaßten Formen des Diabetes sind in ihrer Pathogenese leicht verstehbar. Es liegt ein Mangel an insulinproduzierendem Gewebe vor, das

durch eine entzündliche, iatrogene, traumatische, oder ähnliche Alteration des Gesamtorgans Pankreas bedingt ist.

Berücksichtigt werden muß hierbei, daß Inseln offensichtlich eine beträchtliche funktionelle endokrine Reservekapazität besitzen. So wird ein Diabetes meist erst dann manifest, wenn über 95 % des gesamten Pankreas (z.B. bei einer Pankreatektomie) entfernt oder zerstört (Pankreatitis) sind (174).

1.2.4 Endokrine Diabetesformen

Endokrin induzierte Diabetesformen sollen nur kurz der Vollständigkeit halber erwähnt werden. Sie beruhen entweder auf der verstärkten Wirksamkeit kontrainsulinärer Hormone (z.B. Glucagon) oder auf einer Überproduktion Glukose bereitstellender Hormone (z.B. bei Akromegalie, Conn-Syndrom, Cushing-Syndrom, Apudom).

Abbildung 3 zeigt nochmals einen groben Überblick über die hier aufgeführten Diabetesformen.

Typ I Diabetes (IDDM)

- juveniler Diabetes
- abruptes Einsetzen
- bevorzugte Manifestation im Kindesalter
- Neigung zur Ketoazidose / insulinpflichtig
- Insulinitis / B-Zelldestruktion
- Autoimmunprozesse
- HLA Assoziation

Sekundärer Diabetes

- Pankreatitiden
- Pankreasca
- Pankreaszysten
- Pankreatektomie

Abb. 3:Typ II Diabetes (NIDDM)

- Erwachsenenenddiabetes
- zufällige Diagnose
- Erkrankungsalter meist > 40 Jahre
- diabetische Massnahmen reichen zur Stoffwechselkontrolle
- B-Zellreduktion
- Überernährung

Endokrin Induzierter Diabetes

- Akromegalie
- Cushing
- Conn
- Phäochromozytom
- Glukagonom (APUDOME)

2. BEHANDLUNGSMÖGLICHKEITEN EINES DIABETES

Die therapeutischen Ansätze zur Behandlung eines Diabetes dürfen sich nicht mehr nur an der Letalität des Diabetes orientieren. Seit der Einführung des Insulins ist die Frühletalität deutlich gesunken (80). Umso stärker rückt das chronische diabetische Spätsyndrom und seine Folgen in den Blickpunkt. Die einzelnen Komponenten dieses Syndroms sind in Abbildung 4 nochmals dargestellt.

Chronisches diabetisches Spätsyndrom:

- Makroangiopathie
- Mikroangiopathie
- Neuropathie
- Retinopathie
- Nephropathie
- Darmerkrankung
- Blutfett- und Leberstoffwechselstörung
- Haut- und Schleimhauterkrankung

Abb. 4:

Dieses Spätsyndrom trägt vor allem zu der noch immer verminderten Lebenserwartung, aber auch zu der verminderten Lebensqualität eines Diabetikers bei. Hiervon sind vor allem die Typ I Diabetiker, zumeist also junge Menschen, betroffen.

Daraus ergibt sich, daß sich die Güte eines Therapieansatzes vor allem daran messen lassen muß, inwieweit es gelingt, das Spätsyndrom in den Griff zu bekommen. Abbildung 5 zeigt die drei wichtigsten denkbaren Therapieansätze zur Behandlung eines Typ I Diabetes und gibt stichpunktartig die damit verbundenen Probleme an.

THERAPIEANSÄTZE ZUR BEHANDLUNG EINES TYP I DIABETES

INSULIN

Probleme:

- Langzeitschäden schwer vermeidbar
- Antikörper
- Dosierungsanpassung

TRANSPLANTATION

Probleme:

- | | |
|--|------------------------|
| <u>Inseln</u> | <u>Pancreas</u> |
| - Ausbeute | - operativ - technisch |
| - Transplantationsort | - Organkonservierung |
| - Verunreinigung der Transplantationspräparation | - exokrine Drainage |
| - Abstossung | - Abstossung |

PRÄVENTIVE IMMUNSUPPRESSION

Probleme

- Indikation
- Nebenwirkungen

Abb. 5:

2.1 Insulin

In großem Rahmen ist bisher einzig die Insulintherapie praktikabel. Trotz verschiedenster Insulinpräparate und verschiedenster Applikationsverfahren gelingt es jedoch nicht, eine physiologische Stoffwechselregulation herzustellen. Stets steht am falschen Ort, zur falschen Zeit, die falsche Menge an Insulin zur Verfügung. Kontinuierliche Messungen haben gezeigt, daß auch bei guter Einstellung Blutzuckerspitzen nicht vermeidbar sind und diese relative Instabilität des Blutglukosespiegels wesentlich zur Entstehung des diabetischen Spätsyndroms beiträgt (171).

Auch die nachgewiesene Glykosilierung vieler Funktionsproteine ist Beweis für transiente Hyperglykämien und wird zugleich als Ursache für die diabetischen Spätkomplikationen diskutiert (79). Die in dieser Hinsicht Erfolg versprechenden Insulinpumpensysteme konnten bislang noch keine durchschlagenden klinischen Erfolge zeigen.

Auf weitergehende Probleme der Insulintherapie wie Antikörperbildung, Gefahr der Allergisierung, hypoglykämische Zwischenfälle und ähnliches soll ohne ausführliche Erörterung nur hingewiesen werden.

2.2 Transplantation

Die Transplantation entweder des gesamten Pankreas, oder nur der endokrin wirksamen Langerhans'schen Inseln ersetzt das verlorengegangene Gewebe und erlaubt somit zumindest theoretisch eine physiologischere Stoffwechselregulation. Auch die Transplantation von Einzelzell-Suspensionen bzw. die selektive Transplantation von B-Zellen allein wäre denkbar.

Dem letztgenannten Therapieansatz stehen neben den technischen Schwierigkeiten, B-Zellen selektiv zu separieren, zusätzlich Berichte entgegen, in denen die Wichtigkeit des Zellkontakts zwischen den verschiedenen Zelltypen innerhalb einer Insel für eine physiologische Insulinsekretion betont wird (58).

Generell bietet die Transplantation als Therapie jedoch einen wesentlichen Vorteil: Das chronische diabetische Spätsyndrom kann beeinflußt werden. Mehrere Arbeiten konnten dies zeigen.

Federlin verhinderte mit Inseltransplantation das Fortschreiten einer diabetischen Nephropathie (42). Frühveränderungen an den Glomerula waren sogar reversibel. Andere Gruppen konnten ähnliche Positiveffekte auf die diabetischen Augenkomplikationen (86), auf den Fettstoffwechsel (176, 1) und auf die diabetische Neuropathie (88) zeigen. Diese Daten sind zunächst tierexperimentell erhoben worden.

Auch für die bislang durchgeführten klinischen Pankreastretransplantationen konnte gezeigt werden, daß mit der Transplantation nahezu normale Stoffwechselverhältnisse erreichbar sind (158). Die jüngsten Ergebnisse der Münchner Gruppe zeigen, daß durch eine Transplantation das diabetische Spätsyndrom gebessert bzw. am Fortschreiten gehindert werden kann (98).

So konnten also zumindest für die Pankreastretransplantation die früher gefundenen tierexperimentellen Ergebnisse bestätigt werden (20, 122, 124).

Einschränkend sollte angemerkt werden, daß trotz des positiven Einflusses der Pankreastretransplantation auf die Blutzuckerregulation und damit auch auf das diabetische

Spätsyndrom immer noch Unterschiede zur Stoffwechselregulation gesunder Personen bestehen. Dies läßt sich auf die systemische und nicht intraportale Sekretion des Insulins, auf die fehlende autonome Innervation des Transplantats, Abstoßungsmechanismen und nicht zuletzt auch auf den Einfluß von Medikamenten zurückführen (10, 149, 157).

Die Transplantation als Therapie bietet im Gegensatz zur alleinigen Insulintherapie für den Typ I Diabetiker vom Gesichtspunkt der Stoffwechselkontrolle aus auf alle Fälle Vorteile. Die Lebensqualität eines Diabetikers mit einem problemlos funktionierenden Transplantat kann wesentlich gebessert werden. Die mit der Transplantation verbundenen Probleme, die diese Aussage natürlich einschränken, sind ebenso in Abbildung 5 aufgeführt. Daraus folgt, daß die Pankreas- oder Inseltransplantation derzeit noch nicht als Routinetherapie für den Diabetiker gelten kann.

Die Inseltransplantation ist bis auf einige wenige klinische Versuche noch nicht über das tierexperimentelle Stadium hinausgekommen. Die Pankreastransplantation bedarf wegen ihrer hohen postoperativen Komplikationsrate, auch wenn sie durchführbar erscheint, einer strengen Überprüfung der Indikation. In Abschnitt 3 und 4 wird auf die Probleme, die eine Transplantation von Inseln oder Pankreas mit sich bringt, nochmals eingegangen.

2.3 Immunsuppression

Ein weitgehendes und äußerst attraktives Konzept zur Behandlung des Diabetes ist die präventive Immunsuppression sogenannter "High risk"-Gruppen (Vater und Mutter Diabetiker, HLA-Konstellation DR-3/4, zusätzliche pathologische

Glucosetoleranz, oder ähnliches). Derzeit läuft eine groß angelegte klinische Studie, die zeigen soll, ob z.B. mit Cyclosporine A ein Ausbruch eines Diabetes verhindert werden kann (148).

Erste Berichte erscheinen erfolgversprechend. In den dem menschlichen Typ I Diabetes wohl ähnlichsten Tiermodell, im Modell der spontan diabetischen BB-Wistarratte (BB/W) ist es möglich, mit immunsuppressiven Methoden die Diabetesinsidenz zu senken (82).

Die Kriterien für eine richtige und sinnvolle Indikation zur präventiven Immunsuppression sind jedoch problematisch und kontrovers. Für eine erfolgreiche Therapie erscheint es notwendig, klinisch gesunde Personen immunsuppressiv zu behandeln und alle damit verbundenen Probleme in Kauf zu nehmen. Ist der Diabetes erst einmal symptomatisch geworden, kommt die immunsuppressive Therapie wahrscheinlich zu spät. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits über 90 % der vorhandenen Inselmasse unwiderbringlich zerstört.

3. PROBLEMATIK DER INSELTRANSPLANTATION ALS THERAPIE

3.1 Inselisolation

Die qualitativ und quantitativ ausreichende Inselisolation aus dem Pankreas spielt eine zentrale Rolle für den Erfolg einer Inseltransplantation. Speziell für das menschliche Pankreas ist dieses Problem noch nicht gelöst. Nur ca. 1 bis 2 % des Pankreasgewebes sind Inseln. Verlässliche Absolutzahlen liegen allerdings nur aus Tierversuchen vor.

So besitzt die Ratte bis zu 4000 Inseln pro Pankreas (67). Die Anzahl der Inseln ist stark vom Alter der Ratte abhängig. Tiere, die jünger als 100 Tage sind, besitzen ca. 2000 Inseln (61). In anderen Arbeiten wird sinnvollerweise zusätzlich der Einfluß der Inselgröße und die Relation zwischen B-Zellen in der Insel und anderen Zellen berücksichtigt. Nicht mehr die absolute Inselanzahl, sondern das Inselvolumen wird als Meßgröße genommen. Dabei ergibt sich, daß über die Hälfte aller Inseln einen Durchmesser von 150 μ hat (22). Dies entspricht auch der Größe menschlicher Inseln.

Im Tiermodell Ratte benötigt man zwischen 150 und 400 isogener Inseln, um einen experimentell induzierten Diabetes zu heilen bzw. die Stoffwechsellage zu verbessern (66). Für allogene Transplantationen werden entsprechend mehr Inseln benötigt.

Vesuche, diese Daten rein rechnerisch auf die Situation beim Menschen zu übertragen, ergeben, daß für eine erfolgreiche menschliche Inseltransplantation mindestens 150.000 Inseln benötigt würden (43). Diese Zahl ist bei den bisher wenigen klinischen Transplantationsversuchen noch nicht erreicht worden. Gerade deshalb erscheint es wichtig, an weiteren Verbesserungen der Isolationsmethode zu arbeiten.

Moskalewski gelang es erstmals 1965, Inseln durch eine enzymatische Verdauung aus einem Meerschweinchenpankreas zu isolieren (114). Lacy beschreibt die Methode dann erstmals auch für Ratten und gibt eine Ausbeute von 200 bis 300 Inseln pro Pankreas an (92).

Diese Arbeit könnte ebenso zeigen, daß die Methode der Inselisolation die Inselfunktion beeinflußt. So sieht er in dem hyperosmolaren Medium für die Dichtegradientenzentrifugation eine Ursache für die gestörte *in vitro* Inselsekretion der auf diese Weise gewonnenen Inseln. Diese Arbeiten machten die bis dahin praktizierten Microdissektionstechniken (121) zur Inselgewinnung unnötig.

Das von Lacy angegebene Prinzip der enzymatischen Verdauung mit Collagenase hat sich als Standardverfahren bewährt. Jedoch ist bislang nur dieses Prinzip standardisiert. Die sich daraus entwickelnden Methoden sind äußerst unterschiedlich und der Erfolg beruht sehr auf der individuellen Erfahrung. Viele dieser Isolationsmethoden orientieren sich am Ziel der erfolgreichen Inseltransplantation.

Zunächst gibt es Versuche, die Inselausbeute bereits durch Manipulation *in vivo* zu erhöhen. Die Injektion von Pilocarpin, D-1-ETHIONIN (140), Seleno-DL-Methionin (70) scheinen die Ausbeute zu erhöhen. All diese Maßnahmen sollen zur Verminderung des störenden exokrinen Anteils bereits vor der eigentlichen Inselisolation beitragen. Unter demselben Aspekt kann auch der Versuch der Inselisolation aus fetalem Gewebe gesehen werden (24), da der Anteil von Inselzellgewebe im fetalen Pankreas gegenüber dem exokrinen Anteil relativ erhöht ist.

Weitere Versuche, die Methode der Inselisolation zu verbessern, betreffen *in vitro* Manipulationen am Pankreas vor der enzymatischen Verdauung.

Das Verfahren der mechanischen Distension durch das Einspritzen von Flüssigkeit entweder in den exokrinen Ausführungsgang (92) oder in das Gefäßsystem (35) soll hier erwähnt werden. Vor allem die Distension über das venöse Gefäßsystem scheint bei größeren Säugetieren die Ausbeute zu erhöhen. Zusätzlich kann das Distensionsverfahren mit einer Art Vorverdauung kombiniert werden, wenn man Collagenase in den Ausführungsgang injiziert (68).

Die Phase der Inkubation mit Enzym und damit die Verdauung erweist sich als äußerst sensibel gegenüber Manipulationen. Hierbei gilt es, den Mittelweg zwischen einerseits zu frühem Stoppen der Reaktion und damit ungenügender Auslösung der Inseln aus dem exokrinen Gewebeverband und andererseits dem Andauen der Inseln durch eine zu lange Inkubationszeit zu finden. Zur Optimierung dieses Vorganges speziell bei der Isolation von Inseln größerer Säuger berichtet Scharp über eine Filtrations-Digestionstechnik und den darauf beruhenden Autoisolator (140).

Die Separation der Inseln von der angedauten Zellmasse erfolgt entweder durch Picken der Inseln mit der Hand (94), durch eine Dichtegradientenzentrifugation (162) oder eine Dichtegradientensedimentation (27).

Auch aufwendigste technische Methoden werden benutzt, um Inseln in großem Ausmaß vom exokrinen angedauten Restgewebe zu trennen. So wurden in der Schwerelosigkeit des Raumschiffs Challenger Elektrophoresemethoden zur Separation erprobt (140). Gegenstand jüngster Forschung ist der Versuch, mit Antikörpern Inseln zu markieren und somit einer Separation zugänglicher zu machen (140).

Die vielen Versuche mit neuen Techniken sind letztlich beweisend für die Tatsache, daß die Ergebnisse der Inseliso-

lation noch nicht endgültig befriedigend sind. Die quantitative Ausbeute scheint nur bei Nagern ausreichend. Was die mit den verschiedenen Isolationsmethoden gewonnenen Inseln qualitativ zu leisten in der Lage sind, bleibt vielfach unberücksichtigt.

Wenige Arbeiten beschäftigen sich mit der Beeinflussung der Inseln durch den Isolationsprozeß, sie es auf metabolischer oder morphologischer Ebene. Abbildung 6 faßt die verfügbaren Zahlen über die quantitative Inselausbeute aus dem Pankreas von Ratten zusammen. Trotz vielfältigster Versuche auf diesem Gebiet sind Absolutzahlen von isolierten Inseln bzw. isolierter Inselzellmasse nur verhältnismäßig selten angegeben.

Neuere Arbeiten berichten von erfolgversprechenden Isolationsmethoden aus menschlichem Pankreas (53) bzw. aus dem Pankreas großer Säugetiere (Rind (93), Hund (119)).

Da im Gegensatz zum Pankreas von Nagern das Pankreas größerer Säugetiere wesentlich kompakter ist und stärker bindegewebig organisiert, ist die Inselisolation zusätzlich erschwert. Lacy (93) benutzt zur Isolation Velcro-Monolayer, um den exokrinen bindegewebigen Anteil von den Inseln zu trennen.

Noel (119) berichtet über eine Isolationsmethode, mit der er aus einem Gramm Hunde-Pankreas 3500 Inseln isolieren kann. Am erfolgversprechendsten erscheint eine Arbeit von Gray (53), der 1000 Inseln mit intakter Morphologie und intakter Funktion aus einem Gramm menschlichen Pankreas isolieren kann.

All diese Methoden konnten jedoch bisher in der Literatur nicht reproduziert werden, so daß ihre Wertigkeit noch nicht endgültig beurteilt werden kann.

Inselausbeute nach Isolation aus einem Pankreas

Lacy e. a. (1967)	200 – 300
Ziegler e. a. (1974)	100 – 200
Malonato e. a. (1976)	100 – 200
Lacy e. a. (1979)	200
Morris e. a. (1980)	150
Theodorov e. a. (1980)	350
Perloff e. a. (1981)	250
Reece Smith e. a. (1981)	200
Sutherland (overview) (1981)	150 – 400
Selawry (1984)	6 Spender pro Transplantation

Zusätzlich erhebt sich die Frage, inwieweit es garantiert ist, daß es sich bei den mit diesen Methoden isolierten Inseln um reine Inseln handelt und nicht um einfache pankreatische Microfragmente. Dies wird in der Literatur kontrovers diskutiert (140).

3.2 Inseltransplantation

Die Anzahl der Literaturberichte über Inseltransplantationen in verschiedenen Tiermodellen ist nahezu unübersehbar.

Bei vielen als Inseltransplantationen deklarierten Versuchen handelt es sich aber nicht um isolierte Inseln, sondern lediglich um eine Dispersion von adulten (84, 112, 170) oder foetalen (25) Pankreasfragmenten. Prinzipiell sollte man nur von Inseltransplantation sprechen, wenn die Transplantationspräparation vorwiegend aus isolierten Inseln besteht, die weitgehend intakt, losgelöst von exokrinem Gewebe und weitgehend frei von nicht endokrinen Zellverunreinigungen sind.

Legt man diese Definition zugrunde, sind bisher wirkliche Inseltransplantationen nur erfolgreich bei Nagern durchgeführt worden (150). Dies wird auch in einer neueren Übersichtsarbeit (140) bestätigt. Die Definition erscheint deshalb so wichtig, da durch alle Nicht-Insel-Kontaminationen immunologische Faktoren bzw. die gesamte Abstoßungsproblematik eine andere Bewertung erhalten muß.

Bei den bisher durchgeführten Inseltransplantationen im Ratten- oder Mäusemodell wird der Diabetes der Empfänger

meist durch Streptozotocin oder Alloxan induziert. Dies dürfte wohl auf einer toxischen Wirkung der Substanzen beruhen (109), obgleich über ein "Low-Dose-Streptozotocin Diabetesmodell der Maus berichtet wird, bei dem es Anhaltspunkte für eine immunologische Beteiligung bei der Pathogenese gibt.

Es läßt sich hier beispielsweise eine Insulitis beobachten (69). In anderen Tierspezies konnte dies jedoch nicht nachvollzogen werden. Die totale Pankreatektomie ist ebenso eine Möglichkeit zur Diabetesinduktion (112, 85). Sie erweist sich jedoch aus anatomisch-technischen Gründen nicht bei allen Tieren durchführbar. Zudem erscheint die Methode im ganzen relativ unzuverlässig.

Ein klinisch-relevantes und immunologisch äußerst interessantes Tiermodell für den Diabetes ist die spontan-diabetische BB-Wistarratte (82). In diesem Modell werden zusätzlich die an der Entstehung der Grundkrankheit beteiligten autoimmunologischen Prozesse berücksichtigt.

3.2.1 Transplantationsite

Der Transplantationsort, d.h. der Ort, an den die Inseln transplantiert werden, spielt aus zwei Gesichtspunkten heraus eine wichtige Rolle.

Zum einen geht es um eine möglichst physiologische Insulinabgabe in den Empfängerorganismus, zum anderen gibt es Vermutungen, daß bestimmte "Transplantationsites" immunologische Vorteile bieten und das Inseltransplantat bis zu einem gewissen Grad vor der Abstoßung durch den Empfänger-

organismus schützen. Bei der ersten durchgeführten Inseltransplantation durch Ballinger und Mitarbeiter wurde die Präparation intraperitoneal injiziert (3). Hierbei konnte jedoch nach Transplantation von 400 bis 600 Inseln in einem isogenen Modell lediglich eine vorübergehende Verbesserung der diabetischen Stoffwechselsituation beobachtet werden.

In weiteren Arbeiten stellte sich vom Gesichtspunkt der optimalen Stoffwechselregulation die intraportale Injektion in die Leber als der geeignetste Transplantationsort heraus (77, 78).

Ein Anschluß an das Gefäßnetz des Empfängers wird schnell erreicht (56). Die Insulinsekretion in das portale Gefäßnetz entspricht der physiologischen Sekretion bei intaktem Inselzellapparat im Empfängerpankreas. Die intraportale isogene Transplantation führt zur Normalisierung der den Diabetes kennzeichnenden metabolischen Abnormitäten (176, 150, 167).

Dies geschieht je nach Anzahl der transplantierten Inseln bzw. je nach Schwere der diabetischen Ausgangssituation innerhalb von 1-2 Tagen (65, 165). Die Leberfunktion wird durch die Embolisation der kleinsten Pfortaderäste kaum oder nur minimal beeinflusst (2). Inwieweit langfristig nach portaler Injektion eine Hypertension des portalen Kreislaufes entstehen kann, ist noch nicht endgültig geklärt.

Unter einem anderen, vor allen Dingen immunologischen Gesichtspunkt, ist der Transplantationsort "Nierenkapsel" von Morris und Mitarbeitern untersucht worden. In einem allogenen Transplantationsmodell konnten sie bei Transplantation der Inseln unter die Nierenkapsel eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit gegenüber der Transplantation in das Pfortadersystem beobachten (131).

Bei der Transplantation von Inseln als vaskularisiertes Transplantat (zunächst isogene Inseltransplantation unter die Nierenkapsel, dann allogene Transplantation der Niere mit Inseln) und bei zusätzlichem Einsatz von Immunsuppressiva konnte die Überlebenszeit bis über 100 Tage verlängert werden (132).

Auch im Hundemodell scheint die Transplantation von Pankreasfragmenten unter die Nierenkapsel zu einer Verlängerung der Überlebenszeit zu führen (4). Diese immunologische Privilegierung wird auch für andere Transplantationsorte vermutet.

So gibt es Berichte über erfolgreiche intercerebrale (161) oder intertesticuläre (13) Transplantation. Intramuskuläre oder subkutane Transplantationsorte haben bisher keine Verbesserung der Transplantatüberlebenszeit gezeigt. Teilweise gelingt es nicht einmal, die Hyperglykämie des Empfängers zu beherrschen (140).

3.2.2 Verunreinigung der Präparation

Ebenso wie das Problem der Transplantationsorte, kann das Problem Verunreinigung der Transplantatpräparation unter zwei Aspekten betrachtet werden.

Einerseits wird über Probleme nach Inseltransplantation berichtet, die dadurch entstehen, daß exokrine Anteile mittransplantiert werden und die damit verbundene Proteinasenfreisetzung dem Empfänger schadet (140). Als Folge davon kann z.B. eine diffuse intravasale Koagulation nach Transplantation einer relativ unreinen Präparation beobachtet werden. (110)

Für die Abstoßung scheint jedoch andererseits besonders die Verunreinigung mit lymphatischen Elementen eine wichtige Rolle zu spielen. Finke zeigte, daß es sehr leicht zu Verwechslungen zwischen Inseln und kleinen Lymphknoten während des Isolationsprozesses kommen kann (45).

Auch die nahezu gleiche Dichte von Inseln und lymphatischem Gewebe führt speziell bei Isolationen über Dichtegradienten zu einem Risiko der Kontamination. Die Rolle, die mittransplantierte immunkompetente Zellen bei der Abstoßung spielen könnten, hat Lafferty in seinem theoretischen Konzept der mittransplantierten "passenger Leukocytes" beleuchtet. Demnach sind mittransplantierte weiße Blutzellen, auch Stimulatorzellen genannt, für die Aktivierung des Abstoßungsprozesses bedeutsam (95, 97).

Dieses Konzept ist zwar zunächst vor allem auf die noch im Inselgewebe vorhandenen Zellen bezogen, jedoch erscheint es nicht einsichtig, daß dieser Abstoßungsmechanismus, sofern er eine wichtige Rolle spielt, nicht auch durch außerhalb der Inseln liegende mittransplantierte Zellen in Gang gebracht werden kann.

Die Kultivierung von Inseln unter Kulturbedingungen, die die Leukozytenpopulationen vermindern und die anschließende allogene Transplantation zeigt eine Verbesserung der Transplantatüberlebenszeiten (91). Auf weiterführende Experimente zur Vermeidung einer Abstoßung unter Berücksichtigung der Rolle, die diese Spenderleukozyten spielen könnten, wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

3.2.3 Transplantatabstoßung

Einige Autoren vermuten eine verminderte Immunogenität von endokrinem Gewebe und damit auch ein verbessertes Transplantatüberleben von allogenen Transplantaten (12, 147). Arbeiten von Ziegler (176), aber auch die experimentelle Erfahrung, daß Inseln, vor allem, wenn sie allogene transplantiert werden, kürzer überleben als das gesamte Pankreas, scheinen dies zu widerlegen (150).

Inselzellen selbst präsentieren jedoch keine Class II Antigene, zumindest zeigen dies die Versuche an Ratten (147) und Mäusen (127), wenn versucht wird, die Antigene mit spezifischen Methoden nachzuweisen. Die Expression dieser Antigene scheint jedoch bei der Abstoßung einer Wandlung unterworfen (147).

Somit müßte also, wenn man die verschiedenen Befunde zusammennimmt, eine andere Zelle die Abstoßung einleiten und im Verlauf dieses Prozesses wird die B-Zelle der Insel selbst immunogen. Diese Einleitung der Abstoßung wird vor allem den mittransplantierten Leukozyten zugeschrieben. Inseln, die auf verschiedenste Arten weitgehend von diesen sogenannten "passenger leukocytes" befreit sind, erweisen sich als kaum oder nur schwach immunogen (19).

Die Immunogenität kann durch eine Infusion von Spenderperitonealzellen wieder hergestellt werden, so daß die Transplantate trotzdem abgestoßen werden (90). Dies verdeutlicht nochmals die Wichtigkeit von mittransplantierten, nicht endokrinen Zellen für das Transplantatüberleben.

Gegenüber der Pankreastransplantation bietet die Inseltransplantation den Vorteil, daß das zu transplantierende Organ,

also die Inselsuspension, vor der eigentlichen Implantation bzw. Injektion in vitro bequem Manipulationen unterzogen werden kann.

Ziel wird es hierbei vor allen Dingen sein, die Immunogenität zu verringern. Hierzu sind ausführliche und verschiedenartigste Protokolle beschrieben. Allerdings führen Manipulationen oftmals zu einem Verlust an Vitalität der Inseln. Der Effekt der Inselkultur (91) ist bereits erwähnt worden.

Die Kulturtechniken sind mittlerweile soweit verbessert worden, daß Selawry ohne weitere Immunsuppression und unabhängig vom Grad der Histoinkompatibilität zwischen Spender und Empfänger ein Langzeitüberleben von Alлотransplantaten beobachten kann (145). Es gelingt offensichtlich, beruhend auf den Überlegungen, die Lafferty (96) angestellt hat, eine Art Stillhalteabkommen zwischen Transplantat und Immunsystem des Empfängers zu induzieren, wenn die Mittransplantation von Spenderleukozyten verhindert wird. Auch quantitative Effekte spielen hierbei eine Rolle, so daß es sich wohl nicht um ein Alles-oder-Nichts-Prinzip handelt.

Die Versuche der sogenannten Immunoalteration sind eine logische Konsequenz dieser Überlegungen (89). Zur Immunoalteration zählt neben der Kultur die Vorbehandlung der Transplantatpräparation mit Ia-Antikörpern (39), mit Antikörpern die gegen dendritische Zellen gerichtet sind (41) und auch die Bestrahlung mit UV-Strahlen (59).

Bei all diesen Protokollen kann eine Verbesserung der Transplantatüberlebenszeit teilweise jedoch nur mit zusätzlicher pharmakologischer Immunsuppression gegenüber nicht vorbehandelten Inseltransplantaten beobachtet werden. Wegen der Unterschiedlichkeit der verschiedenen Methoden und der Unter-

schiedlichkeit der benutzten Modelle lassen sich die verschiedenen Befunde schlecht miteinander vergleichen.

Die Vorbehandlung des Empfängers ist eine weitere Möglichkeit, um die Transplantatüberlebenszeit zu verlängern. Dies kann z.B. die Vorimmunisierung des Empfängers mit Spenderblut bewirken, das vorher mittels eines Ia-Antikörpers und Komplement von Ia-Antigen präsentierenden Zellen befreit worden ist (40). Auch reine Spenderbluttransfusion beim Kaninchen verlängert im Zusammenwirken mit einem Antilymphozytenserum das Überleben von Inselallotransplantaten (73). Die Immunisierung mit ultraviolett bestrahltem Spenderblut zeigt denselben Impfeffekt (101).

Auch mit Hilfe der sogenannten Immunoisolation soll versucht werden, mit Hilfe von semipermeablen Membranen den Kontakt zwischen Inseln bzw. den in den Inseln enthaltenen Zellen - also vor allen Dingen den Spenderleukozyten einerseits und den immunkompetenten Zellen des Empfängers andererseits - zu verhindern. Diese Membran muß für Insulin durchgängig sein (141).

Die Technik ist mit nicht unerheblichen Schwierigkeiten verbunden, auf die hier jedoch nicht im einzelnen eingegangen werden kann. Festzuhalten bleibt, daß in keinem Fall ein mit anderen Methoden vergleichbares Allotransplantatüberleben erreicht werden kann.

Auch die direkte pharmakologische immunsuppressive Behandlung der Empfänger ist Gegenstand vieler Versuche, um das Transplantatüberleben zu verlängern. Azathioprin und Prednison zeigten in verschiedensten Dosierungen und Therapie-schemen keine Verbesserung der Inseltransplantatüberlebenszeit (6, 144). Prednison und andere Steroide erscheinen schon

allein aufgrund ihrer diabetogenen Wirkung problematisch. Zu unterschiedlichen Ergebnissen kommt die Literatur bezüglich der Wirkung von Cyclophosphamid (6, 168). Bei Transplantation über schwache Histoinkompatibilitätsbarrieren hinweg zeigt Antilymphozytenglobulin (ALG) eine relativ gute Wirkung (55).

Um ein Langzeitüberleben zu erreichen, muß ALG jedoch langfristig angewandt werden. Auch durch die Applikation von Adenosin Desaminase Inhibitoren und Adenin Arabinosid kann das Transplantatüberleben verlängert werden (102).

Silica, von dem mittlerweile ebenso vermutet wird, daß es den Ausbruch eines Diabetes im BB-Modell verhindern kann (83), scheint auch das Transplantatüberleben von Inseln zu verlängern (115). Diese Wirkung wird auf die Hemmung der Makrophagen zurückgeführt.

Nicht zuletzt aufgrund der guten Ergebnisse bei der Transplantation anderer Organe wurde auch Cyclosporin A (CsA) zur Immunsuppression nach Inseltransplantation eingesetzt (48, 135).

Borel (15) beschrieb die immunsuppressiven Eigenschaften von CsA als erster. Es handelt sich um ein zyklisches Peptid (Molekulargewicht 1202) aus 11 Aminosäuren. In Öl und Alkohol ist es löslich. CsA unterdrückt sowohl in vitro als auch in vivo Immunreaktionen. Die ersten Beobachtungen zeigten ein verlängertes Transplantatüberleben bei heterotopen allogenen Herztransplantaten (75).

Diese ersten Beobachtungen führten zu einer Vielzahl von in vivo Versuchen zur Transplantationsüberlebenszeitverlängerung. Entsprechend sprunghaft nehmen die Publikationen über CsA von Jahr zu Jahr zu. Erwiesen scheint bisher, daß bei der Ratte das Transplantatüberleben von Niere, Herz,

Pankreas, Knochenmark, Herz und kombiniert Herz-Lunge gezeigt (113, 172).

Bei Nagern kann mit Cyclosporin A möglicherweise ein Zustand spenderspezifischer Toleranz erreicht werden. So genügt bei Leberallotransplantation im Rattenmodell eine kurzfristige Behandlung mit Cyclosporin A (CsA), um eine unbegrenzte Organtoleranz zu erreichen (143).

Der Vorteil von CsA gegenüber anderen Immunsuppressiva liegt vor allem darin, daß die T-Lymphozyten beeinflusst werden, B-Lymphozyten und die Hämatopoese jedoch in ihrer Funktion nahezu unbeeinträchtigt bleiben (52). Mittlerweile scheint gesichert, daß CsA die Proliferation von T-Zellen dadurch hemmt, daß die für die Proliferation nötigen Signale und die dazugehörigen Rezeptoren in ihrer Wirksamkeit und in ihrem Zusammenwirken gehemmt werden.

Als Signal wird vor allem Interleukin 2 diskutiert (125, 169, 16). Wenn dieses oder andere Lymphokine in der Anwesenheit von CsA nicht freigesetzt werden, findet keine Generation von cytotoxischen T-Lymphozyten und von sogenannten T-Helper-Lymphozyten statt. Andererseits scheinen jedoch zusätzlich Zellen mit Suppressorfunktion verstärkt in Anwesenheit von CsA gebildet zu werden (125, 169, 16).

Trotz der beschriebenen Wirkungstheorie und der gut bewiesenen experimentellen Wirksamkeit bei manchen in vivo Transplantationsmodellen zeigte Cyclosporin A (CsA) bei der Inseltransplantation kaum ähnlich gute Erfolge, speziell wenn in einem stark allogenen Transplantationsmodell transplantiert wurde.

In einem starken Abstoßungsmodell überleben transplantierte Inseln ca. 4-6 Tage. Mit CsA sahen einige Autoren keine Verlängerung der Überlebenszeiten, selbst wenn sie dabei mit

einer Dosis von 50 mg/kg/Körpergewicht/Tag arbeiteten (136).

Andere hingegen beobachteten eine signifikante Verlängerung der Transplantat-Überlebenszeit auf bis zu 60 Tage (166). Alloinseltransplantate über eine kleine Histoinkompatibilitätsbarriere hinweg zeigen jedoch durchaus eine Verlängerung der Überlebenszeit, wenn die Empfänger mit CsA immunsupprimiert werden (135).

Bei der Ratte konnte aber niemals eine Transplantattoleranz erreicht werden, wie dies bei der Nierentransplantation möglich ist (54). Transplantiert man die Inseln jedoch unter die Nierenkapsel und darauffolgend die Niere allograft auf einen weiteren Empfänger, kann sowohl für die Niere als auch für die Inseln mit 14-tägiger CsA-Gabe ein Langzeitüberleben (größer als 100 Tage) ermöglicht werden.

3.3 Klinische Versuche

Bis 1984 wurden insgesamt 159 allogene Inseltransplantationen durchgeführt. Dabei wurden jedoch niemals reine Inseln transplantiert, sondern meist ein Homogenat aus menschlichem Pankreas, adulten oder fetalen Ursprungs. Versuche, Insulinomzellen zu transplantieren, erwiesen sich nicht als praktikabel.

Die Transplantationsorte und Methoden der Immunsuppression waren so verschieden, daß sie nicht vergleichbar sind. In fast allen Fällen liegen keine Angaben über die ungefähre Inselzellmasse vor, die transplantiert wurde. Im besten

Fall wird über ein einjähriges Transplantatüberleben (100) berichtet. Für längere Zeit wurde allerdings keiner der Empfänger von der exogenen Insulinzufuhr unabhängig. Sie konnte lediglich verringert werden (174).

Erwähnenswert ist vielleicht, daß in keinem Fall über postoperative Komplikationen berichtet wurde. In vielen Fällen sind jedoch keine ausführlichen Dokumentationen zugänglich.

Daß die Inseltransplantation generell einen Diabetes heilen kann, zeigen die Ergebnisse der Inselautotransplantation. Bis 1984 wurden insgesamt 79 Fälle von Inselautotransplantation nach Pankreatektomie bekannt (151). 50 % der Autotransplantatempfänger blieben auf Dauer von weiterer exogener Insulinzufuhr unabhängig.

In den restlichen Fällen war nur eine geringe exogene Insulinzufuhr (8 bis 18 Einheiten pro Tag (174)) nötig. Auch hier wurde von keinerlei postoperativen Komplikationen schwerwiegender Natur berichtet.

Besonders wurde im postoperativen Verlauf kein Pfortaderhochdruck festgestellt und auch die Leberfunktion blieb von gravierenden Störungen verschont (164, 174). Letztlich bleibt allerdings fraglich, wie radikal die Pankreatektomie durchgeführt wurde. Nach autologer intraportalter Inseltransplantation ließ sich jedoch in allen Fällen unabhängig von der Notwendigkeit exogener Insulinzufuhr Insulinproduktion in der Leber nachweisen (159).

4. PROBLEMATIK DER PANKREASTRANSPLANTATION ALS THERAPIE

Bereits eher, als dies bei Inseltransplantaten der Fall war, konnte für Transplantate des gesamten Pankreas gezeigt werden, daß sich durch die Transplantation ein Diabetes mellitus heilen lassen kann (106). Alle tierexperimentell und klinisch durchgeführten Transplantationen des gesamten Organs sind mit einer großen Komplikationsrate behaftet. Aus diesem Grund ist die Inseltransplantation eine attraktive Alternative zur Transplantation des gesamten Organs geblieben.

Die Problematik der technischen Durchführbarkeit einer Pankreastransplantation wird schon alleine durch die Vielzahl der praktizierten Transplantationstechniken deutlich (150).

Um Glukosewerte auf normoglykämische Werte zu senken, müssen mindestens 20 % der normalen Pankreasmasse transplantiert werden (156). Tierexperimentelle Langzeitstudien von pankreastransplantierten Empfängern zeigten neben der Rückkehr zu einer normoglykämischen Stoffwechselsituation ebenso die Verhinderung der sekundären Diabeteskomplikationen (123).

Im Gegensatz zu Inseltransplantationen sezerniert das Pankreastransplantat Insulin meist nicht in den portalen Kreislauf, sondern entweder in die vena iliaca oder in die vena cava je nach venösem Anschluß. Dies scheint neben der autonomen Denervierung des Organs ein Grund für die Erhöhung der basalen Insulinspiegel nach Pankreastransplantation zu sein (11).

Die Bedeutung dieser erhöhten Insulinspiegel für die gesamte Stoffwechselsituation ist noch nicht endgültig geklärt,

jedoch scheinen sich daraus langfristig Probleme zu ergeben (173).

4.1 Operationstechnische Probleme

Die operativ-technische Problematik der Pankreastransplantation ist vor allem durch die Mittransplantation des exokrinen Organanteils bedingt. Dies bringt für den Empfänger keine therapeutischen, sondern nur störende Konsequenzen mit sich. Es wurden viele Verfahren entwickelt, um entweder die exokrine Sekretion ganz zu stoppen, oder sie schadlos für den Empfänger zu drainieren. Jedes dieser Verfahren bringt aber zusätzliche Probleme mit sich.

Die pankreaticoduodenale Transplantation, bei der das Spenderduodenum mit dem Intestinum des Empfängers (106, 32) verbunden wird, zieht vermehrt Komplikationen seitens des Duodenums, wie Nekrose, Ulceration und Anastomoseninsuffizienz nach sich.

- Die Einführung mikrochirurgischer Techniken (103) und damit die Möglichkeit, auch in kleineren Tiermodellen in großen Fallzahlen zu transplantieren, erlaubte bessere Untersuchungen zur Abstoßungsproblematik. So erscheint auch das mittransplantierte Duodenum für eine Abstoßung mitverantwortlich zu sein.

Segmentale Pankreastransplantationen mit der Anastomose des ductus pancreaticus oder der Schnittfläche des Organs (150) haben sich nicht als optimal erwiesen. Insuffizienz der Anastomose nach Aktivierung der Enzyme im Darmlumen und eine

darauf folgende Nekrose des Transplantats bzw. der Transplantatumgebung sind beschrieben (155).

Um die Aktivierung der prinzipiell inaktiven Verdauungsenzyme des Pankreas zu vermeiden, wurden Anastomosen in das harnableitende System durchgeführt (51). Der technische Erfolg dieser Anastomosen scheint jedoch sehr vom Operateur abhängig.

Auch über eine neue Anastomosentechnik des exokrinen Organanteils mit Blase, Jejunum und Magen wird berichtet. Mit Hilfe dieser Anastomosentechnik sollen sich die postoperativen Komplikationen deutlich senken lassen (107).

Um die Anastomosenprobleme zu umgehen, bietet sich als eine Möglichkeit der Verschluß des exokrinen Ausführungsgangs. Die einfachste Möglichkeit ist eine Ligatur (26) des ductus pancreaticus. Es hat sich jedoch gezeigt, daß diese Technik den Austritt von exokriner Sekretionsflüssigkeit nicht völlig verhindern kann (154).

Dies kann jedoch weitgehend durch die Injektion selbsthärtender Polymere (Neoprene) in das exokrine Ausführungssystem vermieden werden (37). All diesen duct-verschließenden Verfahren ist das Entstehen einer Atrophie des exokrinen Gewebes und die Entwicklung einer Fibrose gemeinsam.

Über das Ausmaß dieser Fibrose gibt es unterschiedliche Berichte (21, 138). Die Auswirkungen der Ductokklusion auf das Inselorgan und die damit verbundene Beeinflussung der Stoffwechselregulation sind in ihrer Wertigkeit umstritten (81, 120, 139, 146). Gesichert ist jedoch, daß bei allen Techniken der Ductokklusion eine chronische Entzündung des Pankreas zu beobachten ist (137).

Als Gegensatz zu ductokkludierenden Techniken wurden Pankreata auch mit offenem exokrinen Ausführungsgang, der frei in die Peritonealhöhle drainiert wird, transplantiert. Theoretische Grundlage dieser Technik ist die Tatsache, daß die Verdauungsenzyme inaktiv vorliegen und ihre Aktivierung erst durch die Kinasen des Darmlumens erreicht wird. Das Peritoneum ist fähig, das exokrine Sekret zu absorbieren.

Tierexperimente (137) und klinische Ergebnisse (153) bestätigten dies. Jedoch entwickelte sich bei längerfristig funktionierenden klinischen Transplantaten ein Aszites, so daß diese Technik ebenfalls in ihrer Anwendbarkeit limitiert ist (152). Dafür garantiert diese Technik eine geringe Entzündung und Fibrose des Organs (5).

Wie bei allen Operationen am Pankreas, zeigt sich bei der Pankreastransplantation neben der Drainageproblematik ein zusätzlich erhöhtes perioperatives Risiko für Thrombosen und Embolien.

4.2 Transplantatabstoßung

Im Gegensatz zu Inseltransplantaten kann das Überleben von Pankreas-Transplantaten tierexperimentell bei der Transplantation über eine "major histoincompatibility" (MHC) Barriere hinweg durch Immunsuppression deutlich verlängert werden. Cyclosporin A (CsA) (135) und Azathioprin (87) oder auch beides in Kombination erwiesen sich - wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß - als wirksam.

Auch mit Antilymphozytenglobulin (ALG) ließ sich das Transplantatüberleben deutlich verlängern (163). Die absolute

Verlängerung, die mit den verschiedenen Methoden der Immunsuppression erreichbar ist, hängt stark vom experimentellen Modell und der Dosierung der Pharmaka ab. Herauszustellen ist jedoch, daß CsA einen ähnlich guten experimentellen Effekt auf Pankreas-Transplantate wie auf Nierentransplantate hat. Bisher konnte aber im Tierexperiment mit einer Cyclosporine-Kurzzeittherapie kein permanentes Transplantatüberleben erreicht werden, wie dies bei der Nierentransplantation möglich ist (47).

4.3 Klinische Ergebnisse

Seit 1966 (Stand November 1985) wurden ca. 450 Pankreastransplantationen durchgeführt. Die größten Fallzahlen hat die Gruppe aus Minnesota, USA, vorzuweisen. Hier werden auch lebende Spender akzeptiert.

Wurde anfangs das Pankreas nur dann transplantiert, wenn gleichzeitig aufgrund einer terminalen diabetisch bedingten Niereninsuffizienz eine Nierentransplantation durchgeführt wurde, transplantiert diese Gruppe seit 1980 auch das Pankreas alleine (152).

Das über alles gemittelte Transplantatüberleben liegt bei ca. 25 %. Einige Transplantate funktionieren bereits länger als fünf Jahre. Derzeit wird in Minnesota die exokrine Ableitung in das Jejunum favorisiert. Als Immunsuppressiva kommen CsA, Azathioprin und Prednison zum Einsatz.

In Lyon, Frankreich wurden bisher 49 Pankreastransplantationen vorgenommen. Nahezu alle dieser Transplantationen wurden unter Verwendung einer ductokkludierenden Technik

durchgeführt. Das Transplantatüberleben beträgt hier ca. 32 % (36). Alle Transplantationen wurden in Kombination mit einer Nierentransplantation vorgenommen. Zusätzlich zu Azathioprin, Steroiden und Cyclosporine wurde ebenso ALG zur Immunsuppression eingesetzt.

In Cambridge, England, kommt eine segmentale paratope Pankreastransplantation zur Anwendung. Die Gefäße des Spenderpankreas werden dabei an die Milzgefäße des Empfängers anastomosiert und der exokrine Ausführungsgang in den Magen abgeleitet. Neuerdings wird hier zusätzlich zu Cyclosporine ein monoklonaler Antikörper (campath 1) zur Abstoßungsprophylaxe verwendet (23). Inwieweit sich die Ergebnisse dadurch auch längerfristig verbessern lassen, steht noch nicht fest.

Auch die Gruppe aus Stockholm, Schweden, berichtet über Verbesserungen der Transplantatfunktion in den letzten Jahren. Sie führt dies vor allem auf eine aggressive Antikoagulation der Empfänger und auf eine bessere Technik bei der Ableitung des exokrinen Ausführungsganges in das Intestinum zurück (160).

In München wurden bisher 43 Pankreastransplantationen durchgeführt. Davon erhielten drei Patienten ein Pankreas ohne simultane Nierentransplantation. Die derzeitige Transplantatüberlebenszeit liegt bei 54 %, wobei 16 dieser Patienten ihr Transplantat erst zwischen ein und zwei Jahren besitzen.

Prolamin wird zur Ductokklusion verwendet (99).

In Europa wird derzeit von der Gruppe aus Barcelona die Pankreastransplantation mit Ableitung des exokrinen Ausführungsganges in das harnableitende System durchgeführt.

Bei einer Gesamtzahl von 10 Patienten wird bisher von einem Langzeittransplantatüberleben berichtet, wobei die relativ hohe Rate an Transplantatversagen vor allem auf Abstoßungsprobleme zurückzuführen ist (50).

Der Prozentsatz an Operationskomplikationen ist in allen Gruppen relativ hoch. Auch die Letalität ist mit bis zu 50 % je nach Gruppe hoch. Hierbei spielt vor allem der schlechte Allgemeinzustand der Empfänger eines Pankreas-Transplantats eine wichtige Rolle, da derzeit die Indikation zur Transplantation nur bei schwersten diabetischen Spätkomplikationen gestellt wird.

Die Abstoßungsproblematik läßt sich bei der Pankreastransplantation noch nicht im gleichen Maße wie bei der Nierentransplantation beherrschen. Die Frage nach der Zerstörung des Transplantats durch persistierende Autoimmunprozesse ist noch nicht geklärt. Gesichert ist jedoch der positive Effekt von funktionierenden Transplantaten auf das diabetische Spätsyndrom.

5. ZUSAMMENFASSUNG DES THEORETISCHEN TEILS

Pankreas- und Inseltransplantation sind wohl die einzigen Therapiemöglichkeiten eines Diabetes mellitus, mit denen es sicher gelingen kann, das chronische diabetische Spätsyndrom wirksam zu bekämpfen. Experimentell lassen sich vor allem bei Nagern Inseln gut isolieren.

Bei Menschen und größeren Säugern gelingt es nicht, in Reinheit und Ausbeute vergleichbare Präparationen herzustellen. Die Abstoßungsproblematik bei der Inseltransplantation ist noch nicht gelöst. Vor allem erstaunt es, daß Cyclosporin A relativ wenig Effekt zeigt, vor allem, wenn tierexperimentell über eine "major histoincompatibility" Barriere hinweg transplantiert wird.

Andere immunmodulierende Verfahren ermöglichen jedoch das Transplantatüberleben zu verbessern, wenn sie vielleicht auch in ihrer klinischen Anwendung problematisch wären.

Pankreastransplantate haben gegenüber Inseltransplantaten bis jetzt deutliche Vorzüge, solange es nur um die Abstoßung geht. Mit Cyclosporin A steht hier ein tierexperimentell und klinisch wirksames Immunsuppressivum zur Verfügung. Die operativen Probleme, die durch die Mittransplantation des exokrinen Anteils bedingt sind, bleiben allerdings bestehen. Insofern ist die Inseltransplantation weiterhin eine sinnvolle mögliche Alternative.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. EIGENE FRAGESTELLUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte im Rattenmodell untersucht werden:

- Kann es gelingen, eine Methode zur Inselisolation zu etablieren, die eine "one donor one recipient"-Transplantation ermöglicht und eine weitgehende Reinheit der Transplantationspräparation garantiert?
- Kann Cyclosporin A (CsA) die Transplantationsüberlebenszeit dieser Inseln verlängern?
- Welche Transplantatüberlebenszeiten lassen sich im Vergleich dazu im selben Transplantationsmodell bei Pankreastransplantation erzielen?

Diese Fragestellungen ergaben sich unter anderem aus folgenden Erwägungen:

- Die bisherigen Ausführungen zeigen, daß die Isolationsmethode für die Ausbeute und auch die Abstoßungsproblematik von Inseltransplantaten eine wichtige Rolle spielt und somit auch immer wieder Gegenstand von Untersuchungen sein sollte. Dabei erscheint besonders eine in vitro-Kontrolle der Inselfunktion vor Transplantationen wichtig. Erst das Wissen um die in vitro-Funktion der zu transplantierenden Inseln ermöglicht eine vernünftige Beurteilung und Vergleichbarkeit der in vivo-Ergebnisse.
- Das Tiermodell Ratte erscheint vor allem für Fragen der Abstoßung am geeignetsten, da hier die Unter-

schiede im Grad der Histoinkompatibilität klar definiert sind (57).

- Bei Inseltransplantationen über kleine Histoinkompatibilitätsbarrieren hat Cyclosporin A ebenso wie bei der Pankreastransplantation einen Effekt gezeigt. Dies läßt vermuten, daß es nicht prinzipiell unwirksam bei der Inseltransplantation sein kann. Insofern scheint sein Einsatz zur Immunsuppression im Rahmen dieser Arbeit gerechtfertigt, zumal es auch von wesentlicher klinischer Bedeutung ist.
- Die Pankreastransplantation kann die Wertigkeit der Inselzelltransplantationsergebnisse nur dann relativieren, wenn sie im gleichen Modell mit dem gleichen immunsuppressiven Regime durchgeführt wird. Diese Vergleichbarkeit soll hier im Gegensatz zu anderen Arbeiten gegeben sein.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeine Methoden

2.1.1 Tiere

Als Spendertiere wurden weibliche oder männliche DA-Ratten mit einem Gewicht zwischen 150 und 200 g verwendet. Der Ursprung des DA (dark agouti)-Stamms ist nicht bekannt (44). Seine Haplotypen-Bezeichnung ist $rt1^a$.

In der Gruppe der serologisch verwandten $rt1$ -Antigene ist das $rt1^a$ -Antigen das komplexeste (126). Es weist ein Minimum von 9 "public specificities" auf (57). DA-Gewebe induziert bei Transplantation auf andere Stämme eine starke Antikörperantwort, wohingegen eine reziproke Immunisierung eines DA-Empfängers oft nur schwache Antikörperbildung auch nach langer Hyperimmunisierung zeigt (130).

Für isogene Inseltransplantationsversuche wurden wiederum DA-Empfänger (Gewichtca. 300 g vor Induktion des Diabetes) verwendet. Lewis-Ratten waren hingegen Empfänger bei allogenen Transplantationsversuchen. (Gewicht ebenfalls 300 g vor Diabetesinduktion.)

Der Lewis-Stamm geht auf eine Züchtung des Wistar-Instituts zurück (44). Die Haplotypen-Bezeichnung lautet $rt1^l$. Diese Tiere sind gegenüber pulmonalen Infektionen relativ unempfindlich. Der postoperative Verlauf ist in den meisten Fällen unproblematischer als bei anderen Rattenstämmen.

Aus diesen Gründen wurden für die isogene Pankreastransplantation Lewis-Ratten ebenso als Spender und Empfänger benutzt. Alle Empfängertiere waren männlichen Geschlechts.

Nur männliche Tiere erlauben den relativ sicheren permanenten venösen Zugang über die Penisvene, der für die Volumentherapie während der Operation unbedingte Voraussetzung ist.

Alle Inzuchtratten wurden aus der SPF-Zucht des Zentralinstituts für Versuchstierkunde in Hannover bezogen.

2.1.2 Diabetesmodell

Zur Induktion eines Diabetes mellitus wurde den männlichen Empfängertieren bei einem Ausgangsgewicht von c.a 300 g eine Dosis von 65 mg/kg Körpergewicht Streptozotocin (Sigma, Taufkirchen, FRG) intravenös injiziert. Nach der einmaligen Injektion wurde alle 2-4 Tage Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Gewicht bestimmt.

Tiere wurden als diabetische Empfänger in den Versuch genommen, wenn die Glukosespiegel bei 4 verschiedenen aufeinanderfolgenden Bestimmungen über 16,5 mmol lagen und zwar im Zeitraum zwischen 1 und 3 Wochen nach der Streptozotocin-Injektion. Diese Kriterien wurden nach Jounod modifiziert (74). Zusätzlich wurde ein Gewichtsverlust von mindestens 50 g gefordert.

2.1.3 Glukosebestimmung

Alle Serumglukosewerte wurden mit Hilfe der Glukosedehydrogenasemethode enzymatisch mit einem Auto-Analyzer (Eppen-

dorf ACP 50/40, Eppendorf AG, Hamburg, FRG) aus dem Blut von nicht fastenden Tieren bestimmt. Diese Bestimmungen wurden vom klinisch-chemischen Labor der Universitätsklinik München-Großhadern (Prof. Dr. Vogt) vorgenommen.

2.1.4 Narkose

Vor allen Versuchen, Blutentnahmen und Injektionen wurden die Tiere narkotisiert. Dazu wurden 10 ml Diäthyläther (Hoechst AG, Frankfurt, FRG) in ein abgedecktes Glasgefäß (Durchmesser 20 cm) geschüttet und die Tiere nach ca. 2 Min. in dieses Glasgefäß gesetzt.

Nach Eintritt des Toleranzstadiums werden die Tiere aus dem Gefäß genommen. Ein Plastikonus mit einem äthergetränkten Tupfer wird den Tieren zur Fortsetzung der Narkose über den Kopf gestülpt. Durch Variieren des Abstands zwischen Kopf und Konus läßt sich die Narkose gut steuern.

Bei initialem oder intermittierendem Atemstillstand wurden die Tiere vorübergehend mit einem kleinen Gummischlauch beatmet. Die unerwünschte Nebenwirkung der Ätherinhalationsanästhesie, nämlich die gesteigerte Bronchialsekretion, ließ sich durch die Gabe von 20 I.E. Atropin (Drobena, Berlin, FRG) gut beseitigen.

2.1.5 Blutentnahme

Zur Blutentnahme wurde den narkotisierten Tieren ein kleines Stück des Schwanzes mit dem Skalpell abgetrennt. Ca.

1 ml des aus dem Querschnitt frei abtropfenden Blutes wurden in einem Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, FRG) aufgefangen. Die für die Glukosebestimmung nötige Menge Blut (100 μ l) wurde dann abpipettiert. Serumproben wurden nach der Zentrifugation entweder gleich weiterverarbeitet oder tiefgefroren. Die Blutung am Schwanz wurde mit einer Ligatur versorgt und die Wunde mit Nobecutan-Spray (Astra GmbH, Wedel, FRG) geschützt.

2.1.6 Insulinbestimmung

Insulin wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Insulinradioimmunoassays (RIA) bestimmt (Amersham und Buchler, Braunschweig, FRG). Diese Bestimmungen wurden vom endokrinologischen Labor (PD Dr. Teichmann) der Chirurgischen Universitätsklinik Großhadern vorgenommen.

2.1.7 Intravenöser Glukosetoleranztest

Glukosetoleranzteste wurden nach Transplantation zum Ausschluß einer latenten diabetischen Stoffwechsellage durchgeführt. Nach 12-stündiger Nahrungskarenz wurde den narkotisierten Tieren 1 g Glukose / kg Körpergewicht intravenös über die Penisvene injiziert. Dazu wurde die entsprechende Menge Glukose in 3 ml aqua ad injectionem (Braun, Melsungen, FRG) gelöst. Jeweils zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 Min. nach Glukosegabe wurde Blut zur Blutglukosebestimmung entnommen.

Im einzelnen wurde in folgenden Gruppen ein intravenöser Glukosetoleranztest durchgeführt:

- Erwachsene Lewis- und DA-Kontrollratten
- Diabetische Lewisratten, drei Wochen nach Eintritt des mit Streptozotocin induzierten Diabetes.
- Isotransplantierte DA-Ratten 50 Tage nach Transplantation von 1000 isogenen DA-Inseln.
- Allotransplantierte Lewisratten 10 Tage nach Transplantation von ca. 1000 allogenen DA-Inseln unter immunsuppressiver Therapie.
- Isotransplantierte Lewisratten nach heterotoper Transplantation eines isogenen Lewispankreas.
- Allotransplantierte Lewisratten nach heterotoper Transplantation eines allogenen DA-Spenderpankreas unter immunsuppressiver Therapie.

2.1.8 Immunsuppression

Zur Immunsuppression wurde den Empfängern von Insel- oder Pankreastransplantaten am Tag der Transplantation und an den beiden darauffolgenden Tagen 30 mg/kg Körpergewicht Cyclosporin A (Sandoz, Basel, Schweiz) verabreicht. Dazu wurde Cyclosporin A in einer Konzentration von 30 mg/ml in Olivenöl (Apotheke Klinische Universitätsanstalten, München, FRG) gelöst. Das entsprechende Volumen wurde den Tieren intramuskulär entweder in die Bauchdecke oder in die Muskulatur der hinteren Extremitäten injiziert.

2.1.9 Cyclosporin A-Spiegelbestimmung

Stichprobenweise wurden bei einzelnen Empfängern Blutspiegel von Cyclosporin A bestimmt. Dazu wurde ein kommerziell erhältlicher Cyclosporin-A-RIA (Sandoz, Basel, Schweiz) verwendet. Diese Bestimmungen wurden vom Labor des Transplantationszentrums der Universitätsklinik München-Großhadern (Prof. Dr. Land) durchgeführt.

2.2 Spezielle Methoden für die Inseltransplantation

2.2.1 Inselisolation

Die Spendertiere wurden zunächst anästhesiert und dann am Bauch rasiert. Das gesamte Tier wurde dann in ein Kodan-Bad getaucht, wobei Mund und Nase geschützt waren. Als Operationsunterlage diente eine 30 x 40 cm große Korkplatte, die steril abgedeckt wurde.

Zur Fixation des Tieres wurden feine Nadeln durch die Interdigitalhäute in die Korkplatte gesteckt. Die Narkose wurde wie beschrieben aufrechterhalten.

Alle benutzten Instrumente waren sterilisiert. Die Operation selbst erfolgte unter sterilen Bedingungen, d.h. der Operateur war steril angezogen und trug Mundschutz und OP-Haube. An Instrumenten stand ein kleines mikrochirurgisches Besteck (S & T, Neuhausen, Schweiz), ein bipolarer Koagulator (Aesculap Mikrokoagulator T 20, Aesculap, Tuttlingen, FRG) und ein Besteck für die kleine Chirurgie zur Verfügung. Ebenso waren Yarsagil Mikroclips (FD 753, Aesculap, Tuttlingen, FRG) vorhanden.

Das Abdomen wurde in der Mittellinie oder auch quer mit der Schere eröffnet. Die beiden Nierenarterien wurden als erstes elektrokoaguliert. Nach Aufsuchen und Präparation der Aorta oberhalb ihrer Bifurkation wurde die Aorta zusätzlich unterhalb des Diaphragmas freigelegt.

An dieser Stelle wurde sie dann mit einer Gefäßklemme abgeklemmt. Ebenso wurde der Darm und die ihn versorgenden Gefäße abgeklemmt. Nachdem die Aorta etwas oberhalb ihrer Bifurkation unterbunden worden war, wurde ein Teflonkatheter (65-12, 18 G, Becton & Dickinson GmbH, Heidelberg, FRG) durch einen kleinen Einschnitt in das Gefäß eingeführt.

Über diesen Katheter wurden 40 ml eiskalte Hank'sche Lösung (ohne Phenolrot, ohne Calcium, Apotheken Klinische Universitätsanstalten, München, FRG) mit einem Zusatz von 0,08 mg/ml Neutralrot (3 amino-m-dimethyl-amino-2-methylphenacin-hydrochlorid, Sigma, Taufkirchen, FRG) infundiert.

Bereits nachdem 15 ml perfundiert waren, zeigte sich eine deutliche Färbung des Pankreas. Neutralrot färbt Langerhans'sche Inseln selektiv an. Bereits Bensley (7) hatte sich 1912 diese Methode für histologische Pankreasuntersuchungen zunutze gemacht. Seine Beschreibung lag der durchgeführten in vivo-Neutralrot-Perfusion zugrunde.

Nach erfolgreicher Perfusion, Kriterium dafür ist eine gleichmäßige Rotfärbung des gesamten Pankreas vom Duodenum bis zur Milz, wurde das Pankreas herausgeschnitten. Das sich nicht anfärbende omentale Fettgewebe konnte makroskopisch nahezu vollständig entfernt werden. Das Pankreas wurde dann in einem Petrischälchen auf Eis gelagert.

Die eigentliche Isolation der Inseln wurde durch das Zerschneiden des Pankreas in Fragmente von ca. 1-3 mm Größe

eingeleitet. Diese Fragmente gab man dann in ein auf 37⁰ thermostatisierbares Inkubationsgefäß mit einem freihängenden Magnetrührer (Wheaton, New Jersey, USA). Sie wurden mit 12 I.V. Collagenase pro Pankreas (Collagenase von *Clostridium histolyticum*, 0,6 - 0,8 U/mg, Serva, Heidelberg, FRG) unter fortwährendem Rühren inkubiert.

Zu vermeiden war hierbei der Kontakt des Rührers mit dem Glas, da dies zu einem unerwünschten Zerquetschen von Zellen führt. Die Umdrehungszahl des Rührers betrug 1000 Umdrehungen pro Minute. Die Technik der Kollagenaseverdauung des Pankreas geht auf eine Originalarbeit von Moskalevsky und Lacy (92, 114) zurück.

Der wichtigste und gleichzeitig diffizilste Moment der Inselisolation ist das rechtzeitige Stoppen des Verdauungsschritts. Hierbei ist von großer Bedeutung, den richtigen Zeitpunkt abzugreifen, zu dem die Inseln von exokrinem Gewebe frei sind, jedoch selbst noch nicht angedaut sind.

Deshalb wurden während der Inkubation in Halbminutenabständen kleine Proben steril aus dem Ansatz entnommen und unter dem Auflichtvergrößerungsmikroskop (Zeiss, Oberkochen, FRG) beurteilt. Wenn die Mehrzahl der rotgefärbten Inseln von dem exokrinen Begleitgewebe befreit war, wurde die Inkubation durch Zugabe von 50 ml kalter Hank'scher Lösung gestoppt.

Zusätzlich wurden 400 U/ml Trasylol (Bayer, Leverkusen, FRG) hinzugefügt. Sodann wurde die Suspension in Aliquots von je 10 ml aufgeteilt. Nach Zentrifugation bei 390 g (Rotana K Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen, FRG) wurde der Überstand verworfen und der Bodensatz erneut mit Hank'scher Lösung aufgeschüttelt.

Dieser Waschvorgang wurde 3-4 mal wiederholt. Um eine Agglutination der Zellen zu verhindern, wurde dann zu jedem Aliquot eine Messerspitze DNase (Sigma, Taufkirchen, FRG) hinzugefügt. Das gewaschene und wieder aufgeschüttelte verdaute Gewebe wurde dann auf Eis gelagert. Nacheinander schüttete man dann zum Picken der Inseln aus den Aliquots einige ml in Petrischalen (Falcon 1007, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, FRG), die unter dem Stereoauflichtmikroskop betrachtet wurden.

Die Inseln wurden dann einzeln Stück für Stück durch eine feine ausgezogene silikonisierte Glaspipette in eine zweite Petrischale mit RPMI 1640 gesammelt (80). 500 ml des Mediums wurden 10 ml 1molarer Hepespuffer, 5 ml Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin), 5 ml Antimykoticum, 1 ml Sulfomycin, 5 ml Natriumpyruvat, 200 μ l Merkaptoäthanol (1:100 verdünnt) und Vitamine (alle Zusätze: Gibco, Karlsruhe, FRG) hinzugefügt. Ferner wurde das Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (Boehringer, Mannheim, FRG) versetzt.

Sämtliche Schritte der Inselisolation wurden unter sterilen Bedingungen (sterile Werkbank Ceag, Schirp, Bork, FRG) durchgeführt. Um die Reinheit der Inselpräparation zu erhöhen, wurde der Vorgang des Inselsammelns zweimal wiederholt. Im letzten Sammelschritt wurden die Inseln gezählt. Die Abbildungen 7 bis 11 verdeutlichen nochmals die einzelnen Schritte des Isolationsprozesses.



Abb. 7: Beginn der Neutralrotperfusion. Der Katheter ist in die Aorta eingeführt. Die Aorta ist infradiaphragmatisch mit einer Klemme verschlossen. Das Pankreas ist noch weiß (Pfeil).



Abb. 8: Das Pankreas nach vollendeter Perfusion
Deutlich ist die gute Abgrenzbarkeit vom
hellen omentalen Fett zu sehen

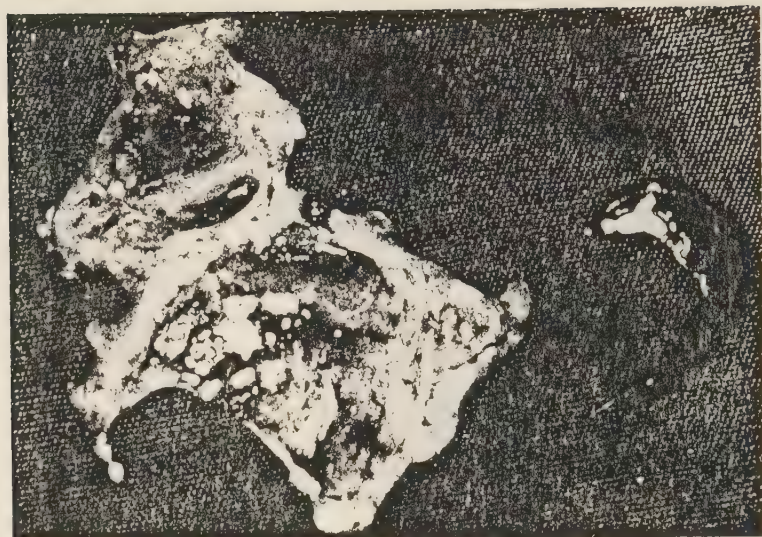


Abb. 9: Das perfundierte Pankreas nach Excision

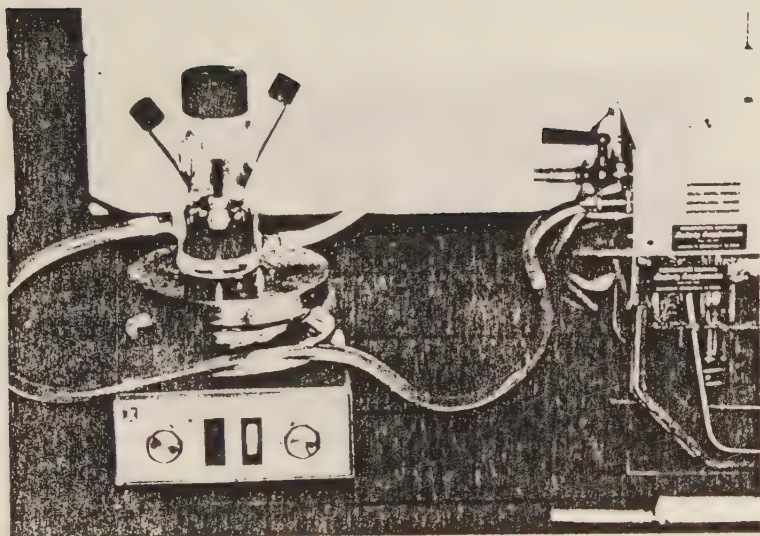


Abb. 10: Geräteaufbau zur enzymatischen Verdauungs-
inkubation

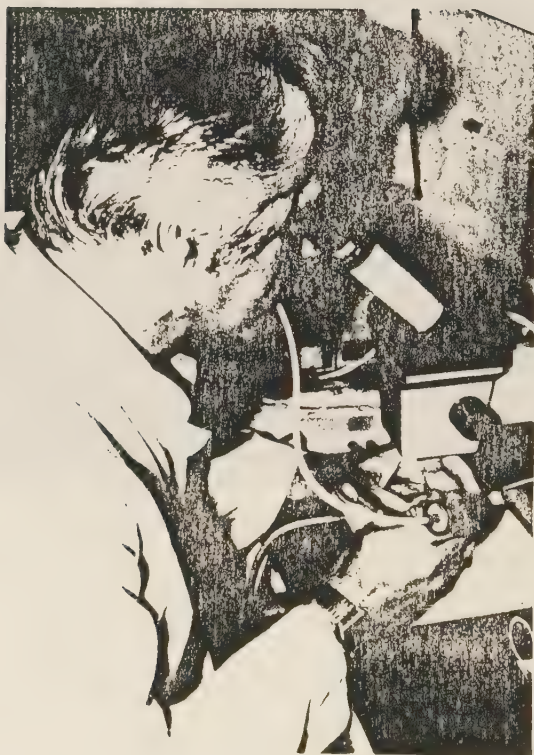


Abb. 11: Picken der Inseln unter dem Auflicht-
mikroskop nach erfolgter Inkubation.

Die hier beschriebene Isolationsmethode erwies sich als die praktikabelste und erfolgreichste Methode (siehe Ergebnisteil).

Im Rahmen der Entwicklung und Etablierung der Isolations-technik wurden jedoch ebenso Versuche mit anderen Isolationsverfahren durchgeführt. So wurde in manchen Versuchen auf die halbminütige Beurteilung des Verdauungszustandes während der Inkubation verzichtet und die Verdauung jeweils exakt nach sieben Minuten gestoppt.

In anderen Ansätzen wurde auf die in vivo Neutralrotperfusion verzichtet. Das manuelle Picken jeder einzelnen Insel wurde in einigen Vorversuchen durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll ersetzt. Dazu wurde eine Ficoll-Stammlösung aus 22,8 g Ficoll 400 (Pharmacia, Freiburg, FRG) und 77,2 g Hank'scher Lösung (Apotheken der Klinischen Universitätsanstalten, München, FRG) hergestellt.

8 ml dieser Stammlösung wurden dann mit dem verdauten Zellmaterial in einem Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, FRG) vermischt. Diese Mischung wurde dann mit 4 ml einer Ficoll-Lösung bestehend aus 18,5 g Ficoll-Stammlösung und 1,5 g Hank'scher Lösung überschichtet. Darüber kamen 4 ml einer weiteren Ficoll-Lösung, bestehend aus 17,4 g Ficoll und 2,6 g Hank'scher Lösung.

Als letzte Lage wurden wiederum 4 ml einer Ficoll-Lösung aus 9,3 g Ficoll-Stammlösung und 10,7 g Hank'scher Lösung überschichtet. Die Inseln wurden nach der Zentrifugation aus dem Interface zwischen der dritten und zweiten Schicht abpipettiert.

Versuchsweise wurde ebenso eine von Buitrago (27) beschriebene Sedimentationsmethode mit Percoll durchgeführt.

Hierbei wurde die verdaute und gewaschene Pankreassuspension auf eine Percoll-Präparation aufgeschichtet. Hierzu wird zunächst eine Percoll-Stammlösung durch die Mischung von 9 Teilen Percoll mit 1 Teil 10-fach konzentrierter Hank'scher Lösung gemischt und in ein Falcon-Röhrchen geschüttet. Diese Lösung wird vorsichtig mit dem verdauten Gemisch überschichtet und für eine Weile ruhig stehengelassen.

Die durch die Percoll-Lösung sedimentierenden Inseln können dann vom Boden des Röhrchens, nachdem der Überstand entfernt worden ist, abpipettiert werden.

2.2.2 In_vitro_Glukosestimulationstest

Um die Vitalität und die funktionelle Integrität der Inseln zu überprüfen, wurden in vitro Glukosestimulationstests durchgeführt. Dazu wurden 150 frisch isolierte Inseln nach 24 Stunden Kultur in RPMI 1640 (mit den bereits beschriebenen zusätzlichen Substanzen versetzt; Kulturbedingungen bei 37⁰ C, 95 % O₂, 5 % CO₂) in glukosefreies Medium transferiert.

Nach einem Zeitintervall von 45 Minuten wurden die Inseln weiter in Medium nun allerdings mit einer Glukosekonzentration von 24 mmol/l inkubiert. Aus dem Überstand wird bis zur 35. Minute in 5-Minuten-Abständen und zusätzlich nach der 60. und 90. Minute der Insulingehalt bestimmt. Die Konzentrierung durch die Probenentnahme wurde bei der Auswertung rechnerisch berücksichtigt.

2.2.3 In_vitro_Glukose-Perifusionstest

Die Funktion von isolierten Langerhans'schen Inseln kann in vitro durch Messung der Insulinausschüttung auf einen Glukosereiz in einer Perifusionskammer überprüft werden. Zur Messung der Insulinausschüttung an durch Collagenase-verdauung hergestellten Inseln, die mit Neutralrot gefärbt waren, wurden 40 Inseln in eine Perifusionskammer gebracht. Nach einer Äquilibrierungszeit von 40 min wurden in Minutenabständen die effluierenden Medien gesammelt. Nach 40 min wurde das Perifusat (3 mM Glukose in Krebs-Ringer-Bicarbonat mit einem Zusatz von 1 mg/ml Rinderalbumin (Behring, Marburg, FRG) bei 94 % O₂, 6 % CO₂, 37⁰ C) auf eine 15 mM glukosehaltige Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung umgestellt.

Die Messungen wurden während der ersten 6 min in Minutenabständen, später jede zweite Minute, durchgeführt. Die Flußgeschwindigkeit wurde bei allen Experimenten auf 1,35 ml/min eingestellt. Nach 80 min wurde das Medium wiederum auf 3 mM Glukose umgestellt, um auch den Verlauf des Abfalls der Insulinausschüttung zu verfolgen. Insulin wurde in den verschiedenen Fraktionen gemessen.

2.2.4 Inseltransplantation

Zur Transplantation der isolierten Inseln wurden diabetische männliche DA- oder Lewis-Empfänger zunächst narkotisiert, rasiert, auf der Operationsunterlage befestigt und dann median laparotomiert. Nach Darstellung der Vena portae wurden durch eine Spritze, in die die Inseln transferiert worden waren, ca.800- 1000 Inseln in die Pfortader inji-

ziert (Kanüle 27 G, 5/8, 0,4 x 16, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, FRG).

Dann wurde durch die Spritze wiederholt und vorsichtig Blut aus der Pfortader aspiriert und reinjiziert. Dieser Vorgang diente dazu, eventuell in der Spritze oder in der Nadel hängengebliebene Inseln in die Pfortader auszuspülen.

Nach Entfernung der Injektionsnadel wurde die Einstichstelle für 3-4 Minuten bis zum Sistieren der Blutung mit einem kleinen Wattetupfer komprimiert. Die Laparotomiewunde wurde dann mit einer fortlaufenden Naht (Vicryl, 4x0, Ethicon, Hamburg, FRG) und einem Nobecutan-Sprayverband versorgt. Zusätzlich wurden jedem Tier zur antibiotischen Prophylaxe 2,5 mg/kg Körpergewicht Totocillin (Bayer, Leverkusen, FRG) injiziert.

Bei ungewollten und ungewöhnlichen größeren Blutverlusten nach Inselinjektion wurde eine intravenöse Volumentherapie (bis zu 3,5 ml) mit Plasmaproteinlösung (4 %, Travenol, München, FRG) durchgeführt. Präoperativ wurde kein Insulin verabreicht. Die Operationsdauer betrug ca. 8-10 Minuten.

Transplantiert wurde in drei verschiedenen Gruppen:

1. Isogene Inseltransplantation von 1 DA-Spender auf 1 DA-Empfänger.
2. Allogene Inseltransplantation von 1 DA-Spender auf 1 Lewis-Empfänger ohne Immunsuppression.
3. Allogene Inseltransplantation von 1 DA-Spender auf 1 Lewis-Empfänger mit Immunsuppression.

2.2.5 Postoperative Verlaufskontrolle nach Inseltransplantation

Unmittelbar nach der Transplantation wurden die Tiere für ca. 1 Stunde in einem Einzelkäfig unter einen Infrarotwärmestrahler gesetzt. Sie hatten jedoch sofort Zugang zu Wasser und Nahrung. Danach ist an jedem 2. bis 4. Tag Blut zur Glukosebestimmung abgenommen worden.

Der Gewichtsverlauf wurde durch Messungen auf einer Digitalwaage (Mettler, PB 3000) im Zweitagesintervall dokumentiert. Nur Transplantationen, bei denen der Empfänger für mindestens zwei Tage einen normalen Glukosewert (unter 16 mmol) zeigte, wurden als technisch erfolgreich gewertet und in die weitere Verlaufsbeobachtung einbezogen.

Transplantate wurden klinisch für abgestoßen erachtet, wenn die Glukosespiegel der transplantierten Tiere nach einer vorübergehenden normoglykämischen Phase wieder über 16 mmol/l anstiegen.

2.2.6 Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)

Milzzellen von DA-Spendertieren und von Lewis-Empfängertieren mit funktionierendem Inseltransplantat und Milzzellen von Lewis-Empfängern, die ihr Inseltransplantat bereits abgestoßen hatten, wurden nach aseptischer Splenektomie gewonnen.

Nachdem die Milz durch ein feines Drahtnetz gepreßt worden war, wurden die Zellen in Dulbecco's multifiziertem Eagles Medium (Gibco, Karlsruhe, FRG) suspendiert. Die Zellsus-

pension wurde auf 1×10^5 Zellen/0,1 ml eingestellt. 0,1 ml der Zellsuspension wurden auf Mikrotiterplatten (Nunk GmbH, Wiesbaden, FRG) auspipettiert. Stimulatorzellen, also Zellen von DA-Spendern wurden mit 2000 rad bestrahlt und 10^5 dieser Zellen wurden zu den Lewis-Responderzellen hinzugegeben. Die Zellen wurden dann für 6 Tage inkubiert (37^0 , 5 % CO_2 , 95 % O_2).

Während der letzten 18 Stunden der Kultur wurde den Zellen radioaktiv markiertes $^3\text{-Thymin}$ zum Einbau angeboten (2 μC /Mikrotiterloch). Die Zellen wurden mit einem Zellharvester (Multimash 2000, Dynatech, Plochingen, FRG) auf Glasfibrerfilter (934 AH Whatman, Clifton, New Jersey, USA) geerntet und die inkorporierte Radioaktivität wurde in einem Liquid Szintillationszähler (Packard, Tri-Carb, Packard, Frankfurt, FRG) bestimmt.

2.2.7 Histologische Untersuchungen an inseltransplantierten Tieren

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und die Leber entnommen. Das Organ wurde in kleinere Teile geschnitten und in Formalin (4 %-ig gepuffert) fixiert. Die fixierten Leberstückchen wurden dann in Parrafin eingebettet und 5 μm dicke Schnitte von diesen Blöcken wurden HE gefärbt bzw. mit Antiinsulinserum beträufelt.

Diese Technik demonstriert Insulin-positive Zellen mit Hilfe der indirekten Immunoperoxidasetechnik (116). Sowohl diese Präparate als auch Präparate von einzelnen isolierten Inseln im Semidünnschnitt wurden von PD Dr. W. Permanen-

ter, Institut für Pathologie der LMU München, angefertigt und beurteilt.

Im einzelnen kamen folgende Tiere zur histologischen Untersuchung:

1. Aus der isogen-inseltransplantierten Gruppe zwei Tiere 200 und 240 Tage nach Transplantation.
2. Aus der allotransplantierten Gruppe ohne Immunsuppression vier Tiere nach klinisch festgestellter Transplantatabstoßung.
3. Aus der allotransplantierten und immunsuppressivtherapierten Gruppe drei Tiere, 110, 129 und 150 Tage nach Transplantation.

2.3 Spezielle Methoden für die Pankreastransplantation

Für die Pankreastransplantation stand ein mikrochirurgisches Instrumentarium (S & T, Neuhausen, Schweiz) und ein Besteck für die kleine Chirurgie zur Verfügung. Die Operation wurde mit einer Lupenbrille (2,5 fache Vergrößerung) durchgeführt.

Für Ligaturen wird Seide 6 x 0, für venöse Anastomosen Prolene 8 x 0 und arterielle Anastomosen Prolene 9 x 0 (alles Ethicon, Hamburg, FRG) verwendet. Die Instrumente wurden regelmäßig sterilisiert, die Operation selbst erfolgte unter sauberen, nicht aber sterilen Kautelen.

2.3.1 Spenderoperation

Nach Narkoseeinleitung und der Gabe von 20 I.E. Atropin wurde das vorbereitete Spendertier mit einer großzügigen queren Schnittführung laparotomiert. Das Pankreas wurde vom Duodenum ausgehend bis hin zur Milz dargestellt und die bindegewebigen Septen zwischen Pankreas und Dickdarm wurden getrennt.

Am Leberhilus wurde die Arteria hepatica unterbunden und durchtrennt. Die Pfortader wurde am Leberhilus von Bindegewebe befreit und auf eine ca. 0,5 cm lange Strecke bis zur Einmündung der Vena lienalis sauber dargestellt.

Daraufhin wurde sie distal in der sie einmündenden pankreatischen Venen unterbunden. Der Darm, soweit er nach diesem Schritt gestaut war, wurde abgeklemmt. Vorsichtig wurde dann das Pankreas aus dem duodenalen C herauspräpariert. Entstehende Blutungen wurden elektrokoaguliert.

Bei diesem Präparationsschritt war darauf zu achten, daß der exokrine Pankreasausführungsgang offen bleibt. Auf Höhe des Pylorus wurde das Pankreas von dem mit ihm bindegewebig verwachsenen Omentum abgesetzt. Schließlich wurde die Milz aus ihren bindegewebigen Verwachsungen gelöst. Sie verblieb jedoch am Pankreas und diente quasi als Handgriff für weitere Manipulationen.

Bevor die das Pankreas versorgenden Gefäße freipräpariert wurden, wurde das Tier heparinisiert (40 I.E. Heparin, Vetren, Promonta, Hamburg, FRG). Die Aorta wurde von distal kommend frei präpariert. Dabei konnte im gleichen Schritt die rechte Nierenarterie unterbunden und durchtrennt werden.

Die Lumbalarterien wurden im Verlauf isoliert, elektro-

koaguliert und durchtrennt. Die Arteria mesenterica und der Truncus wurden an ihren Abgängen aus der Aorta heraus identifiziert und geschont. Die Aorta mußte proximal bis zum Hiatus am Diaphragma dargestellt werden.

Dann wurde das Gefäß infradiaphragmatisch mit einem Yarsagil-Mikroclip (FD 753, Aesculap, Tuttlingen, FRG) abgeklemmt. Sofort darauf folgend wurde das Pankreas retrograd nach der Einführung einer Kunststoffkanüle in die Aorta etwas oberhalb der Bifurkation mit 5 ml kalter heparinisierter Ringerlactatlösung (Braun, Melsungen, FRG) perfundiert.

Nachdem ca. 2,5 ml perfundiert waren, wurde die Pfortader zur Entlastung mit einem sauberen Scherenschlag durchtrennt. Die Perfusion sollte nicht zu schnell und nicht mit zu hohem Druck erfolgen, um spätere Schäden zu vermeiden. Zum Schluß wurde nochmals mit 5 ml Plasmaproteinlösung (4 %ig-Travenol, München, FRG) nachperfundiert. Dann wurde die Aorta infradiaphragmatisch direkt oberhalb des Yarsagil-Clip und auf Höhe der Einstichstelle des Perfusionskatheters durchtrennt.

Bei sorgfältiger Präparation ließ sich dann das Pankreas zusammen mit der Milz, einem Aortenstumpf und einem Pfortaderstumpf, problemlos aus dem Situs in ein Bad mit eiskalter Ringerlactatlösung legen.

Im Konservierungsbad wurde dann die Milz abgetrennt, die Pfortader mit einem Mikrogefäßdilator dilatiert und der explantierte Aortenstumpf an seiner proximalen Öffnung zu recht geschnitten, um für die spätere End-zu-Seit-Anastomose optimale anatomische Verhältnisse zu schaffen.

2.3.2 Empfängeroperation

Die diabetischen Empfängertiere wurden die letzten 12 Stunden vor der Operation nüchtern gelassen. Zusätzlich wurden ihnen drei Einheiten Depot-Insulin (Hoechst, Frankfurt, FRG) verabreicht.

Unmittelbar vor der Operation wurde über ein kleines Butterfly Infusionsbesteck (Venofix 0,5 x 25, Braun, Melsungen, FRG) 3 ml eines Glukoseinsulingemischs (10%-ige Glukose, 2 I.E. Altinsulin) infundiert. Zusätzlich wurden zur prophylaktischen Antibiose 50 mg Totocillin (Bayer, Leverkusen, FRG) und zur Kreislaufunterstützung 1 mg Dobutrex (Lilly, Gießen, FRG) gegeben. Für unvorhergesehene Blutverluste während der Operation wurden 4 ml einer 4%-igen Plasmaproteinlösung (Travenol, München, FRG) vorbereitet.

Zunächst wurde das narkotisierte Tier median laparotomiert. Die infrarenale Aorta wurde dargestellt und von der infrarenalen Vena cava getrennt. Die Gefäße sollten auf einer Länge von ca. 1 cm von allen einmündenden oder abgehenden Venen bzw. Arterien befreit sein.

Dann wurde die Aorte proximal und distal mit einer Mikrogefäßklemme (Yarsagil, FD 753, Aesculap, Tuttlingen, FRG) abgeklemmt und in das ausgeklemmte Aortenstück ein rundes Loch geschnitten. Das Transplantat wurde in eine fechte kalte Mullkompressе eingewickelt, aus dem Konservierungsbad entnommen und so in den Situs placiert, daß das proximale Ende des Spenderaortenstumpfes End-zur-Seit an die Empfängeraorta anastomosiert werden konnte.

Zunächst wurden zwei Eck- und Haltefäden gesetzt. Diese Haltefäden werden mit Yarsagil Microgefäßclips (FD 723) unter Spannung gehalten, so daß sich einerseits das Lumen

der Spenderaorta und andererseits das Lumen der Empfänger-aorta darstellte.

Dann wurde die Vorderwand von links nach rechts überwendlich genäht und mit dem rechten Eckfaden verknotet. Nach Drehung der Operationsunterlage um 180 Grad wurde das Transplantat auf die rechte Seite des Situs gekippt, so daß sich die noch nicht genähte Hinterwand darstellte.

Diese war dann ebenso fortlaufend überwendlich zu nähen. Mit Verknotung dieser Naht mit dem linken Eckfaden war die arterielle Anastomose fertiggestellt.

Dann wurde die distale Klemme an der Empfängeraorta gelöst und unmittelbar distal der Anastomose an den Spenderaortensumpf angesetzt, so daß durch eine retrograde Füllung der Empfängeraorta ein erster Eindruck über die Dichtigkeit der Anastomose entstehen konnte.

Gegebenenfalls wurden mit einigen zusätzlichen Nähten sich darstellende Lecks versorgt. Dann wurde auch die proximal der Anastomose an der Empfängeraorta liegende Mikrogefäßklemme geöffnet, so daß die Empfängeraorta wieder mit normalem Druck perfundiert wurde, ohne daß dabei jedoch schon jetzt Blut in das Transplantat gelangt.

Dann wurde die venöse Anastomose entsprechend der geschilderten Technik genäht. Da jedoch ein Kippen des Transplantats wegen der nun bereits bestehenden Fixierung am arteriellen Gefäßschenkel nicht mehr möglich ist, wird zunächst die Hinterwand vom Lumen des Gefäßes aus genäht (Prolene 8 x 8). Nachdem die Anastomose zwischen vena cava und vena portae fertiggestellt worden ist, wurde die Mikrogefäßklemme von der vena cava entfernt.

In der Regel war die venöse Anastomose nach wenigen Augenblicken blut trocken. Im Gegensatz zur arteriellen Anastomose sind selten Korrekturfäden notwendig.

Die Microgefäßklemme am Spenderaortenstumpf wurde nun ebenfalls geöffnet und nach dem ersten Blutaustritt aus dem noch offenen distalen Ende der Spenderaorta wurde dieses mit einer Microgefäßklemme verschlossen und dann ligiert. Dieses Vorgehen war notwendig, um evtl. im Lumen der Aorta vorhandene Luft entweichen zu lassen und somit einer Luftembolie des Transplantats vorzubeugen.

Bei ordnungsgemäßer Anastomosenfunktion nahm das Transplantat sofort eine rosige Farbe an. Oftmals konnte aufgrund der anfänglichen relativen Überperfusion ein regelrechtes Pulsieren des Transplantats beobachtet werden. Während der Operation entstandene Blutverluste wurden jetzt durch intra-venöse Volumentherapie ausgeglichen.

Abschließend wurden alle Anastomosen nochmals auf Dichtigkeit überprüft und das Omentum des Empfängers über das Transplantat gedeckt. Das Abdomen wurde mit einer fortlaufenden einreihigen allschichtigen Naht (Vicryl 3 x 0) geschlossen und mit einem Sprühverband verbunden.

Es wurden folgende drei Transplantationsgruppen gebildet:

1. Isogene heterotope Pankreastransplantation von einem Lewis-Spender auf einen diabetischen Lewis-Empfänger.
2. Allogene heterotope Pankreastransplantationen von einem DA-Spender auf einen diabetischen Lewis-Empfänger.
3. Allogene heterotope Pankreastransplantation von einem

DA-Spender auf einen diabetischen Lewis-Empfänger mit zusätzlicher Immunsuppression.

Das immunsuppressive Schema entsprach dem bei der Inseltransplantation. Es wurden nur Tiere in die Auswertung genommen, bei denen sich für mindestens zwei Tage postoperativ eine Normoglykämie nachweisen ließ.

2.3.3 Postoperative Verlaufs kontrolle nach Pankreastransplantation

Entsprechend dem Monitoring nach Inseltransplantationen kamen die pankreastransplantierten Tiere zunächst in Einzelkäfige für ca. 1 bis 2 h unter einen Infrarot-Wärmestrahler. Zugang zu Wasser und Nahrung wurde sofort gewährt. Die postoperativen Bestimmungen der Blutglukosewerte erfolgten unter denselben Richtlinien wie bei der Inseltransplantation. Zusätzlich wurden wöchentlich einmal die Amylasewerte aus dem Serum bestimmt.

2.3.4 Amylasebestimmung

Die Amylaseaktivität aus dem Serum wurde photometrisch mit einem Astra 8 (Beckmann, München, FRG) Autoanalyzer bestimmt. Diese Untersuchung wurde vom klinisch-chemischen Labor im Von-Hauner'schen Kinderkrankenhaus der LMU München (Prof. Dr. Bidlingmeier) durchgeführt.

2.3.5 Histologische Untersuchungen an pankreastrans- plantierten Tieren

Zur Gewinnung von Transplantatgewebe wurden einige pankreastransplantierte Tiere in drei- oder sechstägigen Abständen relaparotomiert. Dazu wurde die Laparatomiewunde ausgiebig desinfiziert und das Abdomen im Verlauf der alten Schnittführung wieder eröffnet. Fibrinöse Verklebungen wurden vorsichtig gelöst und das Transplantat makroskopisch inspiziert.

An einem gut darstellbaren Rand des Transplantats wurde ein Stückchen Gewebe abgebunden (Seide 6 x 0) und excidiert. Dieses Gewebestückchen wurde sofort in Formalin (10 %) fixiert. Nach gegebenenfalls nötiger Wundausschneidung wurde die Wunde dann zweischichtig (Vicryl 4 x 0) wieder verschlossen.

Am Ende des Eingriffs wurde wiederum zur antibiotischen Prophylaxe 50 mg Totocillin (Bayer, Leverkusen, FRG) gegeben. Die Gewebestückchen wurden nach ihrer Fixation in Paraffin eingebettet, geschnitten und HE- oder immunhistochemisch auf Insulin gefärbt. Diese Präparate wurden ebenfalls durch PD Dr. Permanetter (Pathologisches Institut der Universität München) beurteilt.

2.4 Statistik

Da der Stichprobenumfang sehr klein ist, wurde ein Test gewählt, der unempfindlich gegenüber Varianzen ist.

Alle Proben wurden zunächst auf Normalverteilung unter-

sucht und anschließend mit dem U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney (60) auf signifikante Unterschiede geprüft. Alle Mittelwerte sind mit Standardabweichung dargestellt.

Definition von:

- Mittelwert: $\bar{x} = \frac{\sum x}{N}$

($\sum x$ = Summe der Einzelwerte,
N = Anzahl der Einzelwerte)

- Standardabweichung:

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

3. ERGEBNISSE

3.1 Inselisolation

Die Ergebnisse der Inselisolation sind auf der Abbildung 12 dargestellt. Aufgetragen ist die Ausbeute an Inseln aus einem Pankreas mit den verschiedenen ausgetesteten Isolationsverfahren. Beachtenswert ist eine deutliche Steigerung der Ausbeute bei Anwendung der *in vivo* Neutralrot-perfusion.

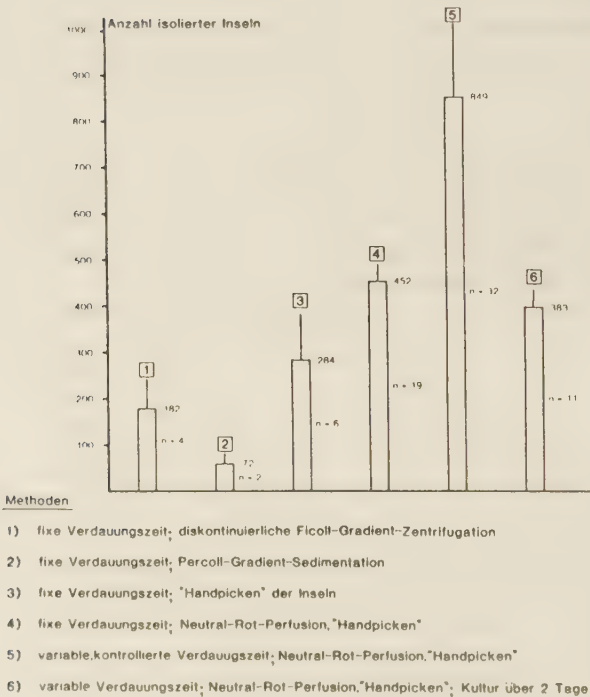


Abb. 12

Abbildung 13 zeigt deutlich die rotgefärbten Inseln unmittelbar nach der Collagenaseinkubation und dem dreimaligen Waschen (Auflichtvergrößerung 25-fach).

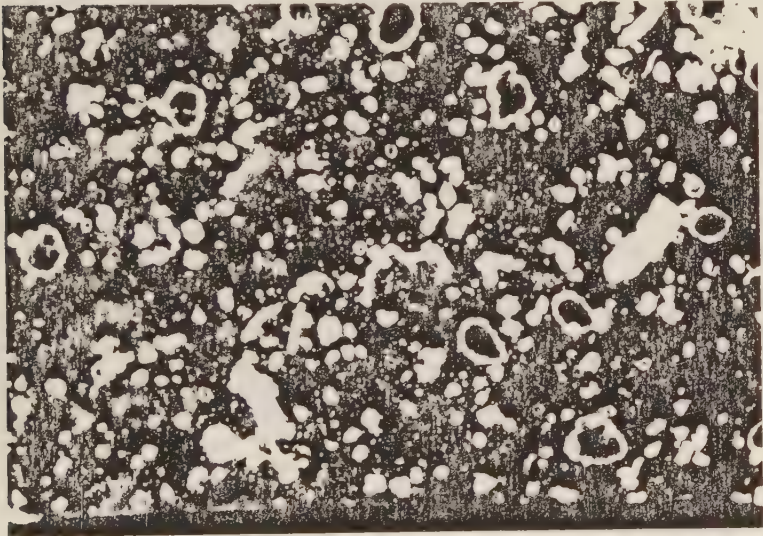


Abb. 13: Rotgefärbte Inseln direkt nach Beendigung der Collagenaseinkubation

Abbildung 14 zeigt eine einzelne Insel nochmals in größerer Vergrößerung (Auflichtvergrößerung 100-fach). Erkennbar ist das weitestgehende Freisein der Inseln von exokrinem Gewebe.

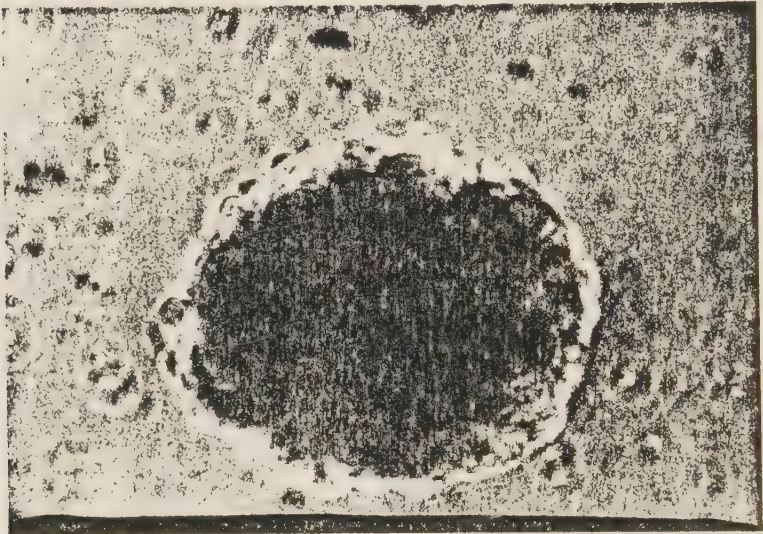


Abb. 14: Insel nach Separation im Auflicht (100 x)

Im Semidünnschnitt (Abbildung 15) in 350-facher Vergrößerung lassen sich die unterschiedlichen Zelltypen gut unterscheiden. In ihrer Morphologie erscheinen die Inseln intakt.

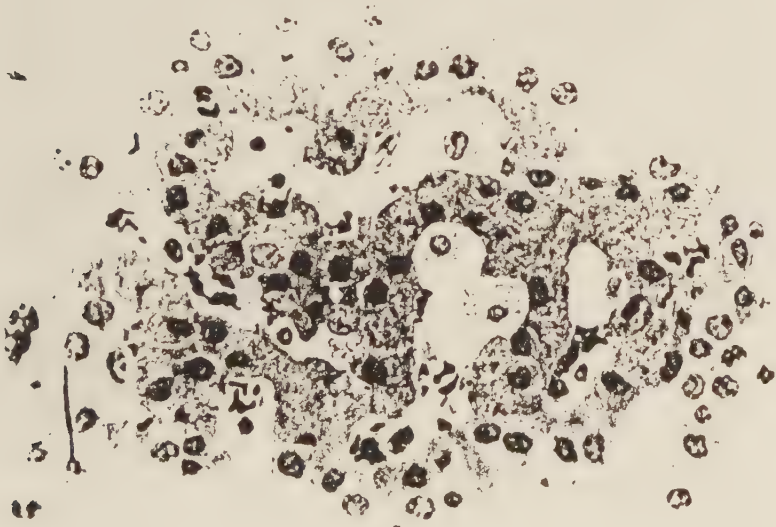
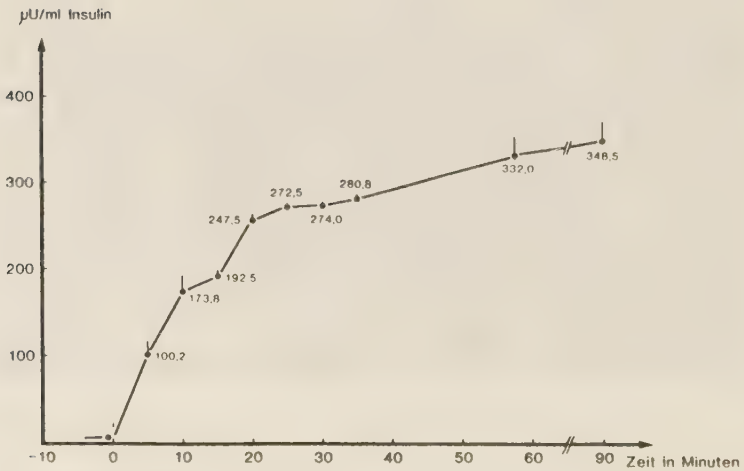


Abb. 15: Insel nach Separation im Semidünnschnitt
(350 x).

3.1.1 In vitro Glukosestimulationstest

Der in vitro Glukosestimulationstest zeigte, daß die isolierten Inseln auf eine Glukose-Stimulation mit einer Insulinproduktion reagieren. Dabei zeigt Abbildung 16 den Verlauf des Anstiegs der Insulinproduktion. Typisch für eine weitgehend intakte Sekretionsfunktion ist der initial steile Anstieg.



i.v. Glukosestimulations-Test

150 Inseln werden nach der Isolation aus glukosefreiem- in Medium mit 450 mg/dl Glukose transferriert.

Proben werden bis 35 Minuten im 5-Minutenabstand entnommen, dann bei 60 Minuten. (n=6)

Abb. 16:

3.1.2 In vitro Glukoseperifusionstest

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse des in vitro Glukoseperifusionstests. Dabei zeigt die die gefüllten Punkte verbindende Linie die Insulinproduktion in pg Insulin/min/Insel nach Glukosebelastung an. Die Linie, die durch die unausgefüllten Punkte gekennzeichnet wird, zeigt die basale Insulinsekretion ebenfalls in pg Insulin/min/Insel an, ohne daß hier eine Glukosebelastung stattgefunden hat.

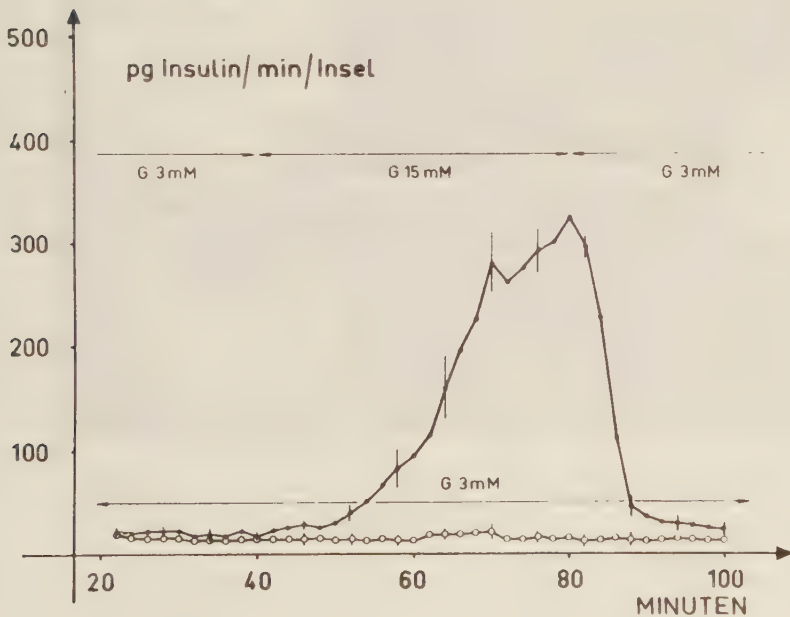


Abb. 17: Kinetik der Insulinausschüttung ohne und mit Glukosestimulation ($n = 4$)

Der Verlauf der Kurve zeigt die für funktionell intakte Inseln typische Konfiguration mit einer Schulter nach ca. 70 min. Die Insulinausschüttung steigt von initial basal 30 pg Insulin/min/Insel auf 330 pg Insulin/min/Insel nach Glukosebelastung an. Wird diese Glukosebelastung gestoppt, sinkt die Insulinsekretion als Zeichen eines intakten Regulationsmechanismus rasch wieder auf die basalen Ausgangswerte ab.

3.2 Inseltransplantation

Abbildung 18 zeigt die Transplantatpräparation unmittelbar vor der intraportalen Injektion. Die rotgefärbten Inseln sind hier bereits makroskopisch erkennbar.

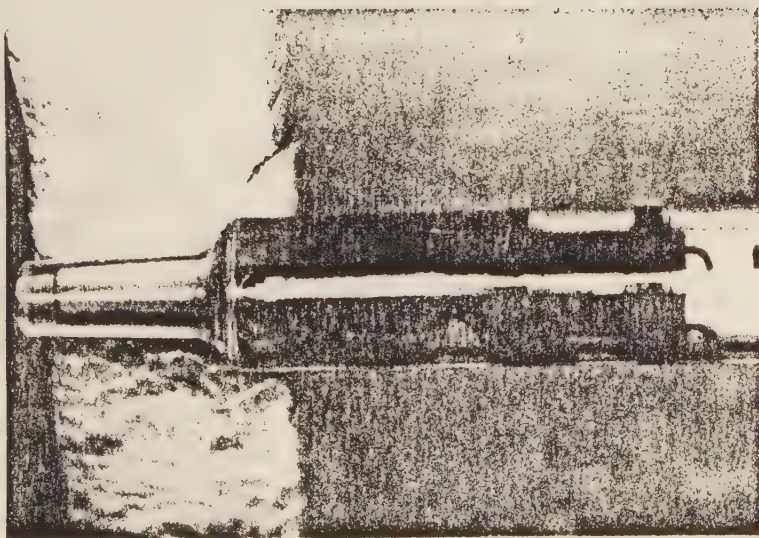


Abb. 18: Spritze mit isolierten Inseln vor der
intraportalen Injektion

Die operative Letalität lag bei 45 durchgeführten Inseltransplantationen bei 8,8 %. Alle vier verstorbenen Tiere kamen durch einen narkosebedingten intraoperativen Atemstillstand, der sich durch Beatmung nicht mehr beheben ließ, ad exitum. Blutungen aus der Injektionsstelle waren stets beherrschbar.

Pfortaderthrombosen konnten nicht beobachtet werden. Als für eine erfolgreiche Inselinjektion besonders wichtig hat sich die schonende, geduldige Kompression der Injektionsstelle erwiesen. Auch die Größe der Kanülen spielt eine wichtige Rolle. Vorversuche mit größeren Kanülen haben in Bezug auf die postoperative Blutung schlechtere Ergebnisse ergeben.

Abb. 19 zeigt den Vorgang der Inselinjektion.



Abb. 19: Intraportale Inselinjektion

3.2.1 Überlebenszeiten

300 bis 1000 mit der Neutralrotmethode isolierte Inseln konnten einen chemisch induzierten Diabetes in isogen transplantierten Tieren ($n = 6$) dauerhaft heilen. Die Tiere blieben für den Beobachtungszeitraum oder bis zum 240. Tag normoglykämisch. Nach der Transplantation nahmen die Tiere kontinuierlich an Gewicht zu und die klinischen Diabetes Symptome (Polyurie, Polydipsie) verschwanden. Die Einzelglukoseverläufe der isogen transplantierten Tiere sind in Abbildung 20 gezeigt.

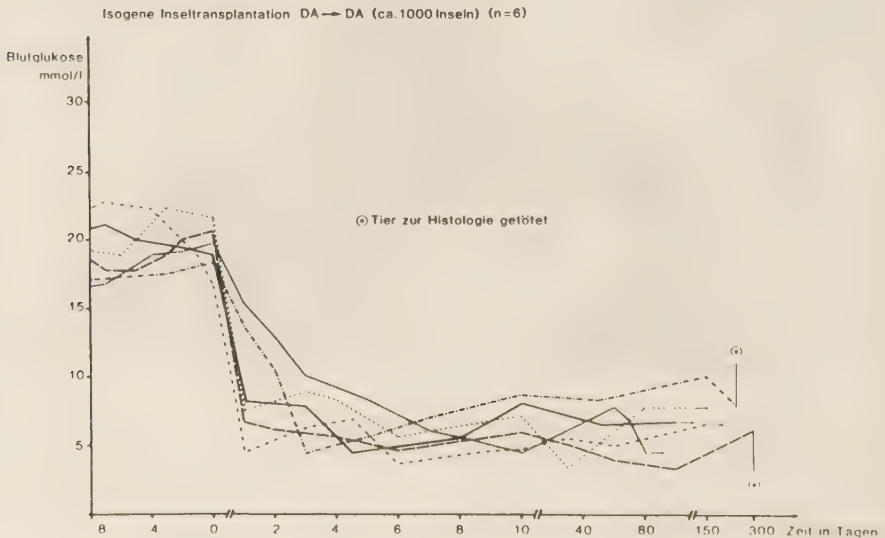


Abb. 20:

Bei allogene Transplantation ($n = 8$) ohne Immunsuppression konnte ein Transplantatüberleben von 3 bis 9 Tagen beobachtet werden. Abbildung 21 zeigt wiederum die Einzelglukose-Verläufe der allogenen transplantierten Tiere.

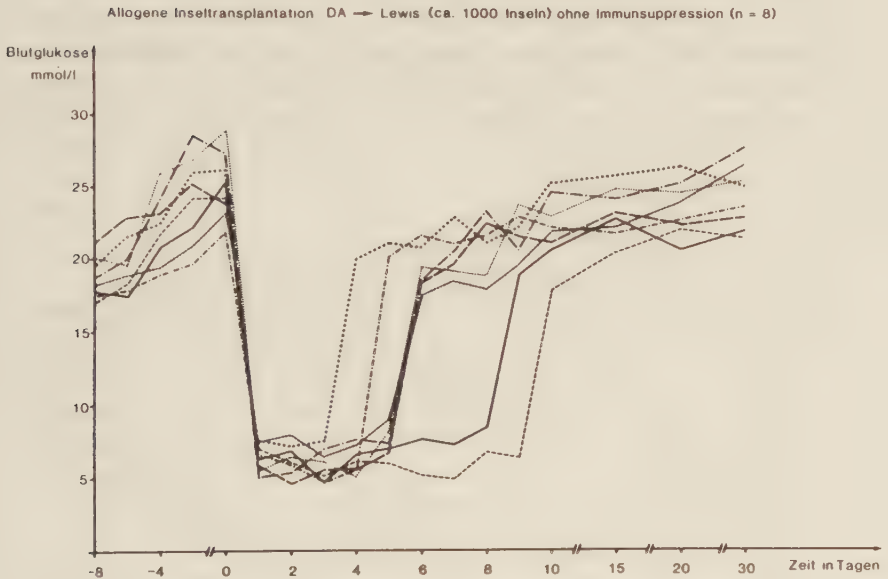


Abb. 21:

Hatten die Tiere ihr Transplantat einmal abgestoßen, veränderte sich der Blutzucker in keinem Fall mehr zu normoglykämischen Werten. Die Tiere überlebten in der Regel in schlechtem Zustand bis zu 35 Tagen nach der klinischen Abstoßung. Zunehmender Gewichtsverlust und die klassischen

Diabetessymptome (Polyurie, Polyphagie, Glykosurie) konnten beobachtet werden. Zusätzlich ergaben sich Anhaltspunkte für eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber Infektionen der Atemorgane.

In der allogenen transplantierten Gruppe mit Immunsuppression konnte eine Überlebenszeitverlängerung auf 28 bis 150 Tage beobachtet werden. Drei Tiere sind über den Beobachtungszeitraum hinaus noch normoglykämisch geblieben. Die Gewichtszunahme nach Transplantation entsprach der Gewichtszunahme der Tiere der isogen transplantierten Gruppe. Die Einzelverläufe der Glukosespiegel zeigt Abbildung 22:

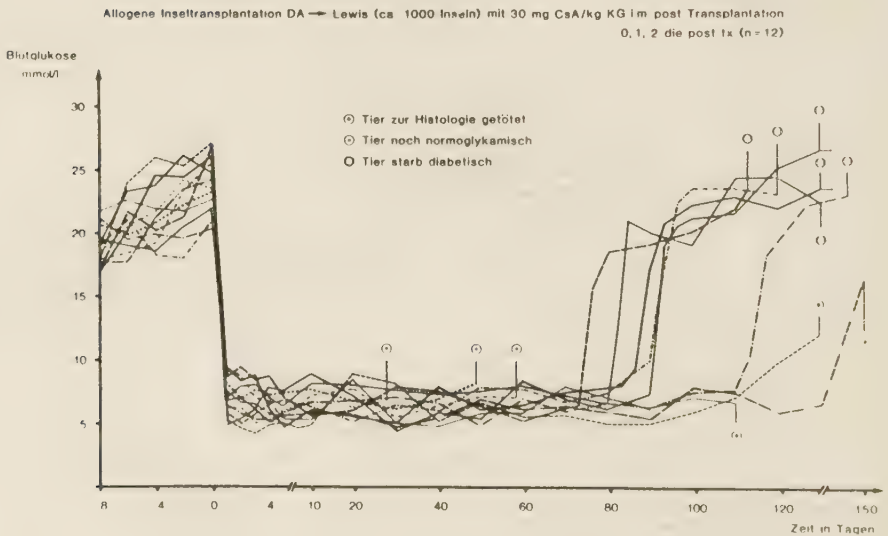


Abb. 22:

Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der Inseltransplantation nochmals zusammengefaßt.

INSELTRANSPLANTAT - ÜBERLEBENSZEITEN

	n	Transplantatüberlebenszeit (Tage)	mittlere Überlebenszeit (Tage)
isogen			
DA → DA	6	>53°, >63°, >68°, 124, 200°, 240°	124,6 ± 78,9
allogen			
DA → Lew	8	3, 4, 5, 5, 5, 5, 8, 9	5,5 ± 2,0
allogen			
DA → Lew			
+ 3 x 30 mg			
CsA/kg KG	12	>28°, >49°, >59°, 73, 82, 88, 94, 110°, 111, 117, 129°, 150°	90,8 ± 35,1
0, 1, 2 die p.tx			

- Tier zur Histologie getötet
- Tier noch normoglykämisch

Abb. 23:

3.2.2 Cyclosporin A-Spiegel

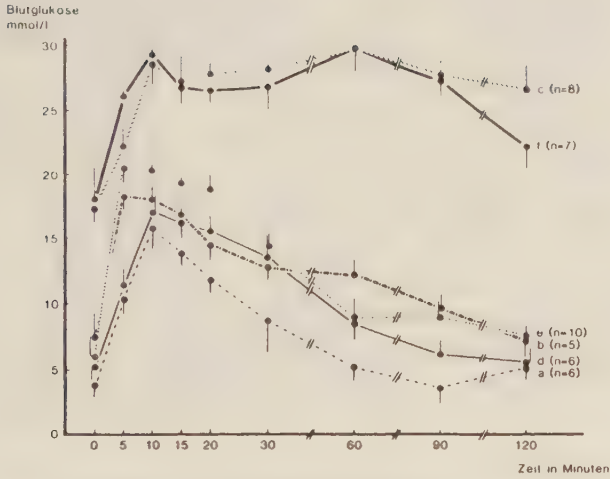
Cyclosporin A-Spiegel wurden stichprobenweise bestimmt. Systematische Messungen konnten aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden. Jedoch ließen sich in allen Proben

wirksame Spiegel nachweisen. So ergaben sich 70 Tage nach Transplantation noch Werte um 90 ng Cyclosporin A/ml.

3.2.3 Intravenöse Glukosetoleranzteste

Die intravenösen Glukosetoleranzteste fielen bei erfolgreich transplantierten Tieren nicht signifikant unterschiedlich gegenüber normalen Kontrolltieren aus. Tiere aus der allogenen immunsupprimierten erfolgreich transplantierten Gruppe zeigten gegenüber isotransplantierten Tieren keinen Unterschied. Die berechneten K-Werte bewegten sich im Normbereich. Abbildung 25 (S. 92) zeigt die einzelnen Kurven der Glukosetoleranz.

Tiere mit abgestoßenem Transplantat zeigten, wie auch diabetische Kontrollen, pathologische Verläufe der Glukosetoleranz. Die Letalität innerhalb dieser Gruppen während des Tests waren erhöht. Die bei Durchführung des Tests verstorbenen Tiere wurden nicht berücksichtigt.



i.v. Glukosetoleranz-Test mit 1g Glukose/kg Körpergewicht von

- a) erwachsenen DA-Kontrollratten
- b) erwachsenen Lewis-Kontrollratten
- c) diabetischen Lewis-Ratten nach Injektion von 65 mg Streptozotocin/kg Körpergewicht nach dreiwöchigem Diabetes
- d) isogen transplantierte DA-Ratten mit ca. 1000 Inseln 50 Tage nach Transplantation
- e) allogene transplantierte Lewis-Ratten mit ca. 1000 Inseln und 3 x 30 CsA/kg Körpergewicht 50 Tage nach Transplantation
- f) allogene transplantierte Lewis-Ratten mit ca. 1000 DA-Inseln und 3 x 30 mg CsA/kg Körpergewicht 10 Tage nach Abstossung

Abb. 24

3.2.4 Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)

Die MLC ergab keine signifikanten Unterschiede im Stimulationsindex zwischen Zellen von Tieren, die ihr Allotransplantat bereits abgestoßen hatten und Zellen von Tieren, die noch ein funktionierendes Allotransplantat besaßen. Es konnte allerdings auch methodisch bedingt kein Schluß gezogen werden, ob eine teilweise spenderspezifische Toleranz induziert worden war.

3.2.5 Histologische Untersuchungen

Die histologische Aufarbeitung der Lebern inseltransplantierte Tiere bedeutet stets, daß das entsprechende Tier für die weitere Beobachtung der Transplantatfunktion nicht mehr zur Verfügung steht. Deshalb mußte auf großangelegte histologische Untersuchungen zunächst verzichtet werden.

In allen Präparaten von normoglykämischen Tieren nach Inseltransplantation konnten viele Portalfelder mit integrierten Inseln beobachtet werden. Die Inseln waren immunhistochemisch positiv auf Insulin. Speziell in der mit Cyclosporine behandelten Gruppe konnte ein erstaunlich breites, manchmal auch vakuolisiertes Cytoplasma der Inselzellen beobachtet werden. Abbildung 25 zeigt eine frischembolisierte Insel in einem Portalfeld in Vergrößerung nach HE-Färbung.

Dieses Präparat stammt von einem isogen transplantierten Tier 10 Tage nach Transplantation. Die Morphologie von Insel und Leber ist unauffällig (100-fache Vergrößerung HE).

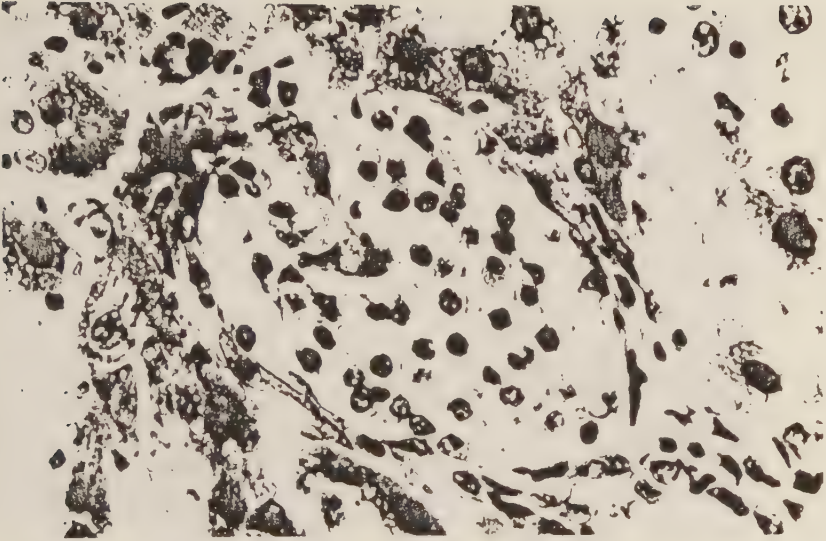


Abb. 25: Isogen transplantierte Insel (Tag 10)
in der Leber (100 x HE)

Abbildung 26 (100-fache Vergrößerung HE) zeigt ein Präparat eines Tieres aus der cyclosporine-behandelten Gruppe 150 Tage nach Transplantation. Das Tier war bis zu diesem Zeitpunkt normoglykämisch. Nur eine minimale Infiltration um die Inseln konnte demonstriert werden.

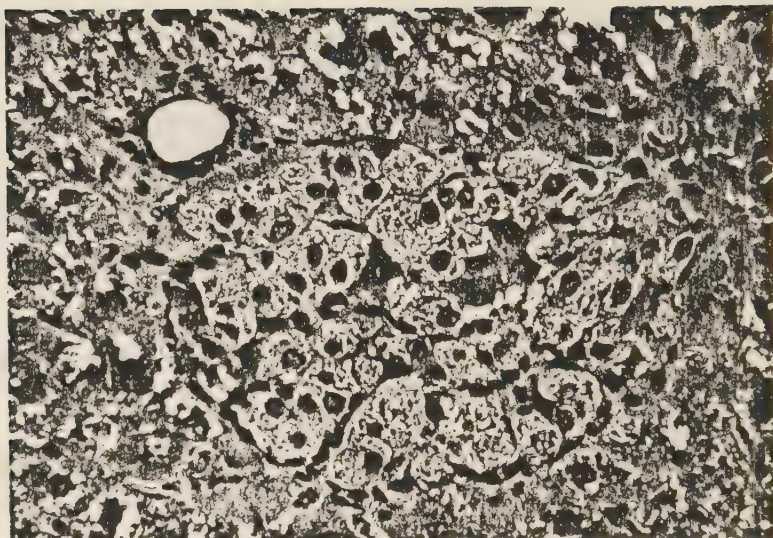


Abb. 26: Allogen transplantierte Insel (Tag 150) mit
CsA in der Leber (100 x HE)

Abbildung 27 (100-fache Vergrößerung) zeigt dasselbe Präparat nach immunhistochemischer Färbung auf Insulin. Die Inselzellen sind deutlich erkennbar Insulin-positiv.

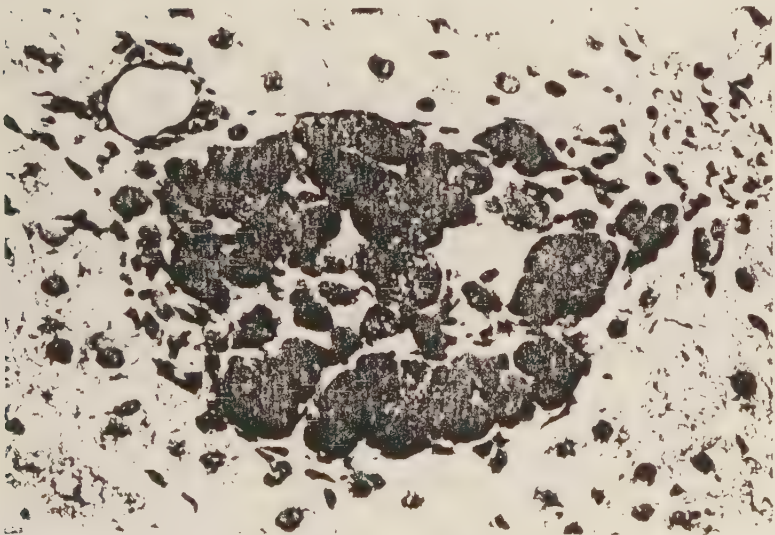


Abb. 27: Allogen transplantierte Insel (Tag 150) mit CsA in der Leber (100 x immunhistochemisch auf Insulin gefärbt)

In Abbildung 28 (100-fache Vergrößerung) kann eine deutliche stärkere lymphozelluläre Infiltration beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um ein Präparat eines Tieres aus der immunsupprimierten Gruppe 110 Tage nach der Transplantation. Klinisch zeigte sich ein langsamer Anstieg der Blutglukosewerte.



Abb. 28: Allogen transplantierte Insel (Tag 110)
mit CsA in der Leber (100 x HE)

Die immunhistochemische Färbung auf Insulin zeigte entsprechend kaum mehr Insulin-positive Zellen (siehe Abbildung 29 - 100-fache Vergrößerung):

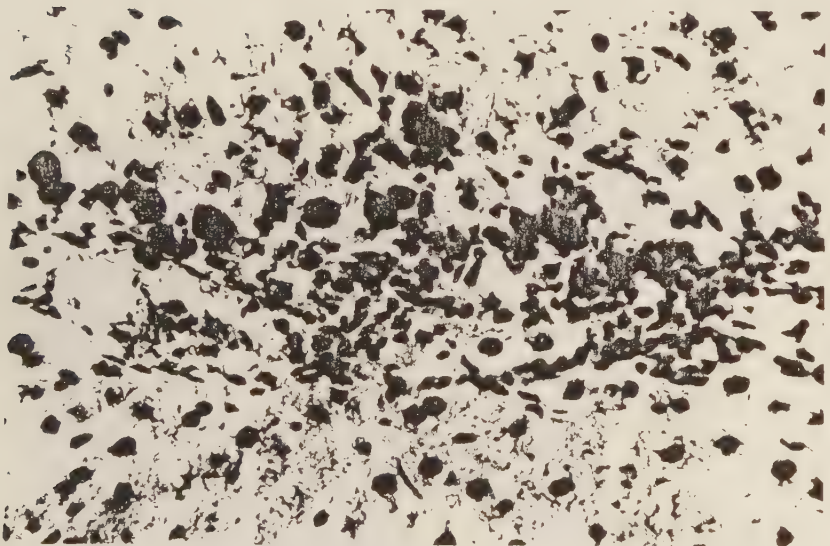


Abb. 29: Allogen transplantierte Insel (Tag 110) mit CsA in der Leber
(100 x immunhistochemisch auf Insulin gefärbt)

In einem anderen Tier aus der Cyclosporine-behandelten Gruppe (siehe Abb. 30) 129 Tage nach Transplantation zeigte sich ähnlich wie in der isogenen Gruppe keinerlei lymphatische Infiltration. Das thrombembolische Material ist in den Portalvenen organisiert und mit einer Art neuer Intima bedeckt. An anderen Stellen des Präparats sind ganze Pfortaderäste mit Inselzellkomplexen gefüllt.



Abb. 30: Allogen transplantierte Insel (Tag 129)
mit CsA in der Leber (60 x immunhistochemisch
auf Insulin gefärbt)

Abbildung 31 zeigt das Präparat eines Tieres nach vollendeter klinischer Abstoßung des Transplantats. Die Inseln lassen sich nicht mehr erkennen. Die lymphozytäre Infiltration bleibt jedoch weitestgehend auf das Portalfeld beschränkt. Immunhistochemisch lassen sich keine Insulin-positiven Zellen mehr nachweisen.

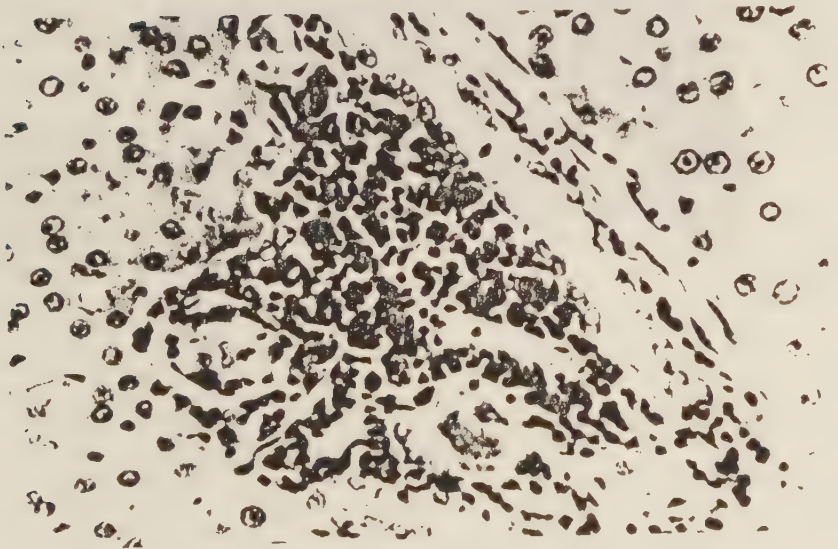


Abb. 31: Abgestoßene Insel in der Leber (100 x HE)

3.3 Pankreastransplantation

3.3.1 Operationstechnische Erfahrungen

Der einwandfreie Zustand des Transplantats ist Grundvoraussetzung für den Erfolg der Transplantation. Vor allem zeigte sich, daß sorgfältiges, vorsichtiges Präparieren bereits während der Explantation Blutungen aus kleinen Gefäßen des Organs nach der Anastomosierung des Transplantats im Spender unwahrscheinlicher macht.

Sind diese Organblutungen - also keine Anastomosenblutungen - erst einmal aufgetreten, waren sie in den meisten Fällen nicht mehr zum Stillstand zu bringen, ohne größere Anteile des Organs opfern zu müssen.

Abbildung 32 zeigt ein Explantat kurz vor der Implantation. Zur besseren Orientierung ist die Milz noch nicht abgetrennt. Durch den venösen Rückstrom nach Beendigung der Perfusion vor Durchtrennung der vena portae sind einige Venen retrograd gefüllt.

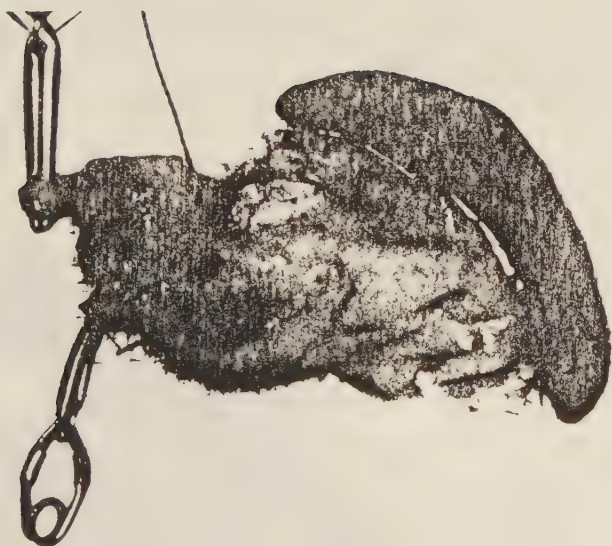


Abb. 32: Pankreasexplantat Vene und Arterie sind mit
Microgefäßklemmen markiert.

Größere operationstechnische Probleme traten naturgemäß bei der Anastomosierung der Gefäße auf. Es erwies sich als bisweilen äußerst schwierig, den Mittelweg zwischen Insuffizienz und Stenose der Anastomose, vor allen Dingen der arteriellen, zu finden.

Vor allem auf Anastomosenblutungen geht die hohe operationstechnisch bedingte Letalität von 65 % zurück. Abbildung 33 zeigt eine vollendete, arterielle Anastomose vor Öffnung der Microgefäßklemmen.

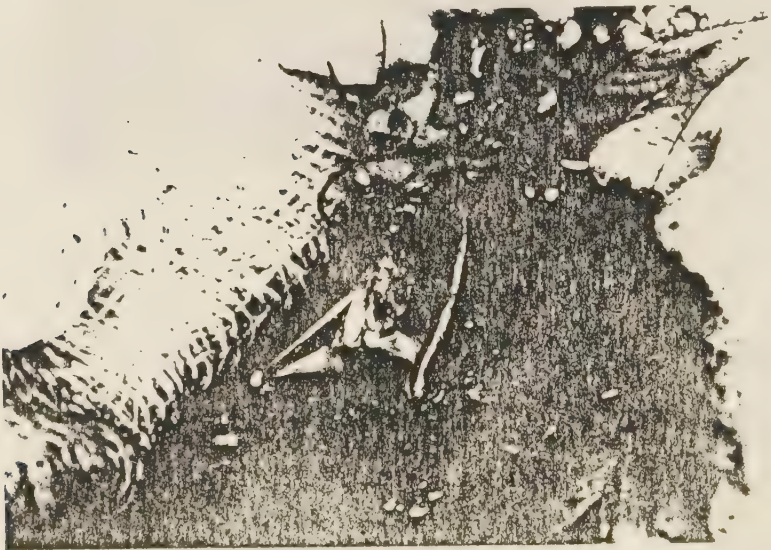


Abb. 33: Arterielle Anastomose

Nach Öffnen der Klemmen kommt es vor allem auf die schnelle Kontrolle evtl. auftretender Blutungen und auf die entsprechende Volumensubstitution an.

Auch die Narkosesteuerung erwies sich manchmal als ungenügend. Speziell wenn die Operationsdauer über 60 min betrug, stieg die Anzahl der auftretenden Atemstillstände an. Nicht alle konnten mit der beschriebenen Methode der Beatmung therapiert werden, so daß viele Operationen kurz vor ihrer Vollendung wegen Atemstillstand abgebrochen werden mußten.

Die Dauer der Spenderoperation betrug zwischen 25 und 40 min. Die Dauer der Empfängeroperation betrug zwischen 30 und 75 min.

3.3.2 Überlebenszeiten

Im isogenen Modell transplantierte Organe zeigten während des Beobachtungszeitraumes eine unbeeinflusste Funktion. Die Glukosewerte normalisierten sich spätestens am 2. Tag nach der Transplantation.

Abbildung 34 zeigt die Einzelglukose-Verläufe der isogen transplantierten Tiere.

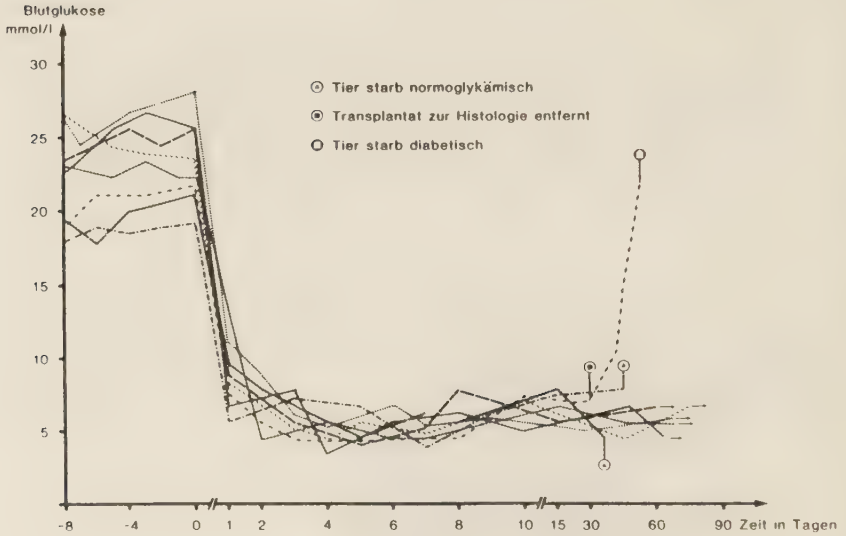
Isogene heterotope Transplantation Lewis $\rightarrow$ Lewis (n=8)

Abb. 34:

Bei einem Tier erfolgte die operativ wegen der Verwachsungen schwer durchzuführende Transplantatenentfernung. Dies resultierte in einer sofort wiederkehrenden diabetischen Stoffwechsellaage, die kurz darauf zum Tode des Tieres führte.

Allogene heterotope Pankreastransplantate überlebten zwischen 4 und 7 Tagen.

Abbildung 35 zeigt die Einzelverläufe der Glukosespiegel

Allogene heterotope Pankreastransplantation DA $\rightarrow$ Lewis (n = 6)

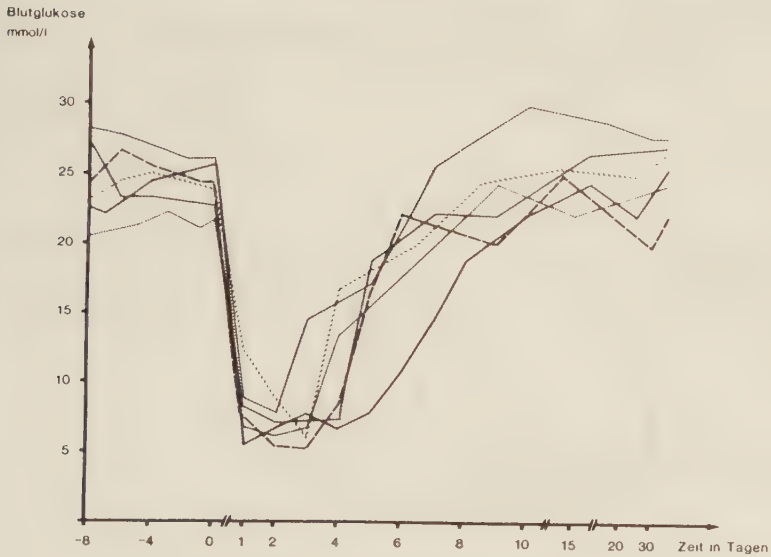


Abb. 35:

Allogene heterotope Pankreastransplantate mit der auch bei der Inseltransplantation erfolgten Immunsuppression ($n = 9$) überlebten zwischen 30 und 69 Tagen. Auch hier führte die operative Transplantat-Entfernung bei einem bis dahin normoglykämischen Tier zu diabetischen Blutglukosewerten.

Abbildung 36 zeigt die Einzelglukose-Verläufe in dieser Gruppe:

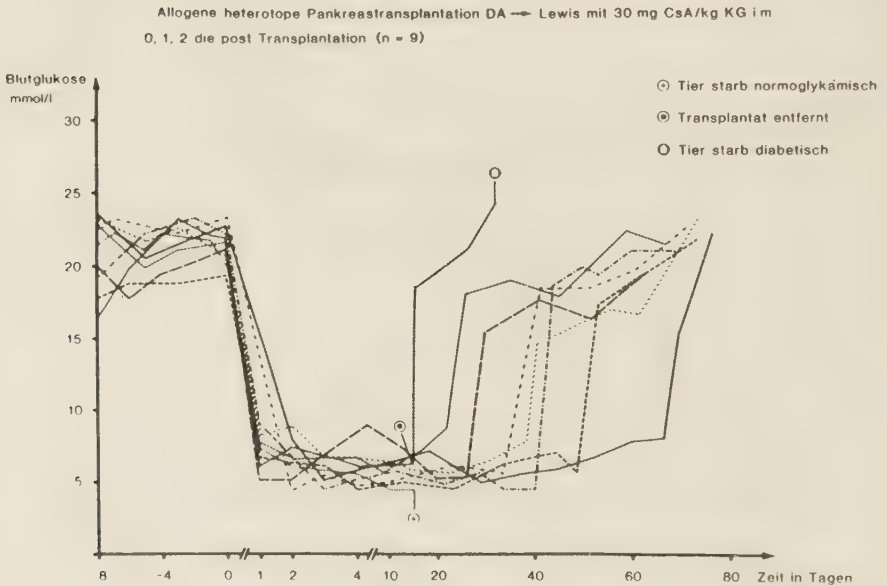


Abb. 36:

Abbildung 37 gibt nochmals einen Überblick über die klinischen Überlebenszeiten der heterotopen Pankreastreansplantate:

ÜBERLEBENSZEITEN VON HETEROTOPEN PANKREASTRANSPLANTATEN

	n	Transplantat- überlebenszeit (Tage)				mittlere Transplantat- überlebenszeit (Tage)	
isogen Lewis → Lewis	8	38*	> 60	> 60	> 60	> 50,9	± 13,6
		44*	25*	> 60	> 60		
allogen DA → Lewis	6	4	7	5	3 4 5	4,7	± 1,4
allogen DA → Lewis	9	30	42	26	15*	37,0	± 17,8
± 3 x 30 mg CsA/kg KG		44	52	41	14*		
0, 1, 2 die post tx		69					

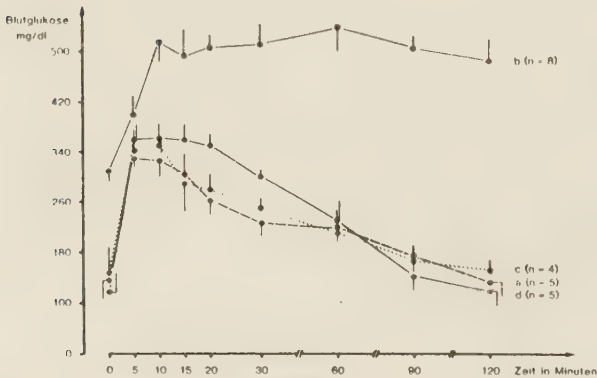
* Tier starb normoglykämisch

* Transplantat wurde zur Histologie entfernt

Abb. 37

3.3.3 Intravenöse Glukosetoleranzteste

Die durchgeführten Glukosetoleranzteste schlossen einen latenten diabetischen Status der Tiere mit funktionierendem Pankreastransplantat aus. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen transplantierten Tieren einerseits und normalen Kontrolltieren andererseits. Abbildung 38 zeigt den Verlauf der Kurven in den einzelnen Gruppen.



i.v. Glukosetoleranz Test mit 1g Glukose/kg KG von:

- a) erwachsenen Lewis Kontrollratten
- b) diabetischen Lewis Ratten nach Injektion von 65 mg Streptozotocin/kg KG nach 3 Wochen diabetischer Stoffwechselleage
- c) isogen transplantierte Lewis Ratten mit vaskularisiertem heterologen Lewis Pankreastransplantat 50 Tage post Transpi
- d) allogene transplantierte Lewis-Ratten mit vaskularisiertem heterologen DA Pankreastransplantat und 3 x 30 mg CsA/kg KG im 30 Tage post Transplantation

Abb. 38:

3.3.4 Amylasebestimmungen

Die durchgeführten Amylasebestimmungen rangierten zwischen 4 und 399 U/l. Es mußte festgestellt werden, daß sich keinerlei Korrelation zwischen Transplantatfunktion oder Zeitabstand zur Operation mit den Amylasewerten feststellen ließ. In einzelnen Fällen ließ sich ein Abfall der Werte im Verlauf beobachten.

Insgesamt ergaben die Werte jedoch kein schlüssiges Ergebnis, so daß auf die graphische Darstellung verzichtet wurde.

3.3.5 Histologische Untersuchungen

Die transplantierten Tiere ertrugen die durchgeführten Laparotomien zur Gewinnung von histologischem Probematerial durchwegs gut. Lediglich kleine abgegrenzte Granulome an den Wundrändern, die jedoch in toto excidiert werden konnten, traten auf.

Makroskopisch konnte bis Tag 6 in allen Fällen eine relativ starke Schwellung des Organs beobachtet werden. Ab Tag 15 konnte dann bei den Tieren mit funktionierendem Transplantat das transplantierte Pankreas in seinen Grenzen aufgrund der entstehenden Verwachsungen meist nicht mehr vollständig von anderen Organen abgegrenzt werden.

In der Gruppe der allogenen transplantierten Tiere ohne Immunsuppression zeigte sich makroskopisch um den 5. Tag nach Transplantation ein hochrotes geschwollenes Transplantat. Bei hyperglykämischen Glukosewerten konnte das Transplantat ab dem 12. Tag nur noch als abgekapselter kirschgroßer

gelblich-brauner Tumor identifiziert werden. Bei Eröffnung dieses Tumors ergoß sich wässriges, leicht eingefärbtes Sekret. Die Kapsel war ausgefüllt mit einem nekrotisch zerfallenden, matschig-grau-gelblichen Material.

Die histologische Aufarbeitung ergab bei klinisch funktionierenden Transplantaten keinerlei Auffälligkeiten. Meist waren in dem Biopsiestückchen ca. 5-8 Inseln mit erfaßt. Das exkretorische Parenchym war regelrecht strukturiert. Entzündliche Infiltrate lagen nicht vor.

Abbildung 39 zeigt eine Insel in einem Pankreas 30 Tage nach isogener Transplantation (Vergrößerung 100-fach HE).

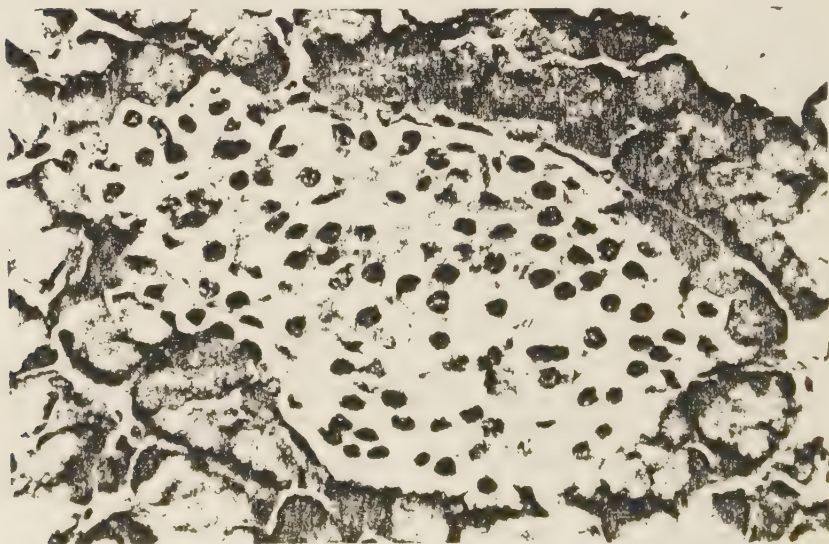


Abb. 39: Isogen transplantiertes Pankreas (Tag 30)
(100 x HE).

In Transplantaten der allogenen Gruppe mit Immunsuppression ließen sich in der Umgebung von Gefäßen kleine lymphoplasmazelluläre Infiltrate demonstrieren. Klinisch zeigte sich jedoch noch keine Veränderung der Blutglukosewerte. Diese trat erst 6 Tage später auf.

Dann ließ sich eine deutliche lymphozelluläre Infiltration des gesamten Organs beobachten. Auch die Inseln sind in diese Reaktion mit einbezogen. Dieser Befund läßt sich im Sinn einer Transplantatreaktion interpretieren. Abbildung 40 zeigt dieses Präparat (Vergrößerung 100-fach HE).

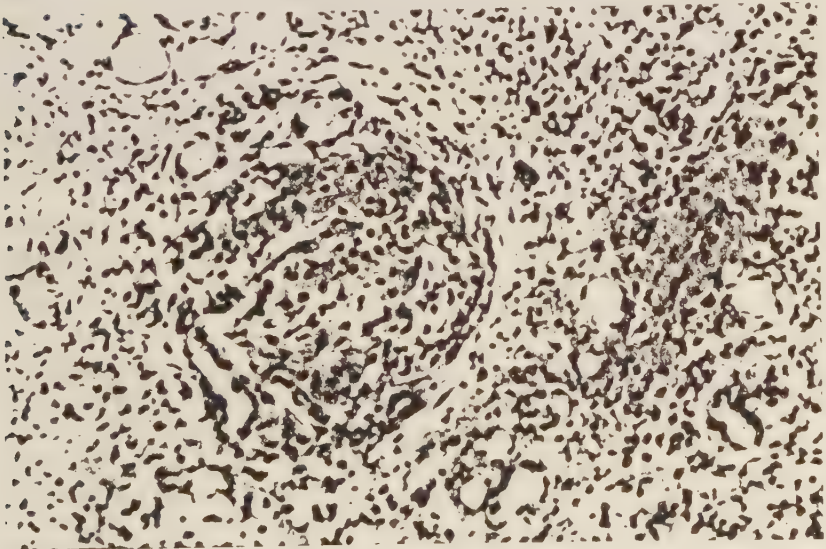


Abb. 40: Abgestoßenes Pankreas (100 x HE)

Auch die immunhistochemische Testung auf Insulin ergab eine deutliche Verminderung der Insulin-positiven Zellen (siehe Abbildung 41, Vergrößerung 100-fach):

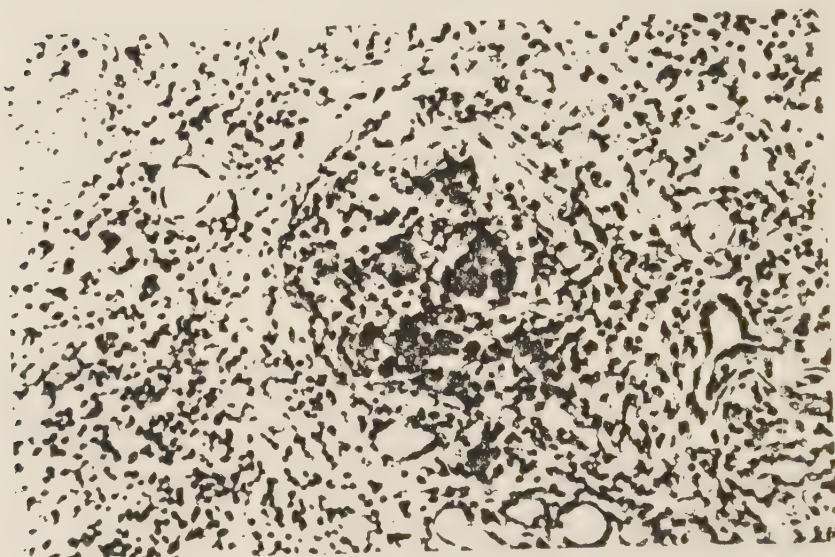


Abb. 41: Abgestoßenes Pankreas (100 x immunhistochemisch auf Insulin gefärbt)

Die weitere Aufarbeitung der histologischen Befunde könnte sicherlich noch weitere interessante Aufschlüsse über den Verlauf von Abstoßungsreaktionen ergeben, doch würde dies den Rahmen der experimentellen Fragestellung sprengen, so daß sich die Arbeit auf die beschriebenen Ergebnisse beschränkt.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Abbildung 42 faßt die Ergebnisse stichpunktartig zusammen:

ZUSAMMENFASSUNG

- Es gelingt mit der modifizierten "neutral red" Methode 800–1200 Inseln aus einem Spenderpancreas zu isolieren, so dass in einem "one donor one recipient" Rattenmodell transplantiert werden kann.
- Isogen transplantierte Inseln heilen einen chemisch induzierten Diabetes mellitus bei Ratten dauerhaft
- Allogen transplantierte Inseln überleben $5,5 \pm 2,0$ Tage.
- Ciclosporin ermöglicht eine deutliche Verbesserung der Überlebenszeit auf $90,8 \pm 35,1$ Tage
- Allogene Pancreastransplantate überleben $4,7 \pm 1,4$ Tage ohne Immunsuppression.
- Mit Ciclosporin kann die Transplantatüberlebenszeit auf $37,0 \pm 17,8$ Tage verlängert werden.

Abb. 42:

4. DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methoden

Das in dieser Arbeit verwendete Diabetes-Modell läßt einige Fragen unberücksichtigt. Durch die toxische Induktion der Hyperglykämie kann eine für die multifaktorielle Genese des humanen Diabetes typische Situation nicht nachgeahmt werden.

Speziell unter dem Gesichtspunkt der autoimmunologischen Beteiligung erscheint es für Transplantationsversuche jedoch wichtig, diesen Aspekt zu berücksichtigen. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, inwieweit persistierende Autoimmunprozesse gegen eigenes B-Zellgewebe nicht auch nach Transplantation das Transplantatüberleben beeinflussen.

Solche autoimmunologischen Vorgänge werden bei Transplantationsversuchen im Modell der BB/W-Ratte mit einbezogen (50). Andererseits müssen als Grundlage für solche Versuche Daten aus "einfachen toxischen" Diabetes Modellen vorliegen. Nur so kann der Einfluß von allogener Transplantatabstoßung aufgrund von Histoinkompatibilitätsbarrieren gegenüber einer Autotransplantatzerstörung durch persistierende Immunprozesse näher abgegrenzt werden.

Die Definition der Abstoßung ist in dieser Arbeit rein klinischer Natur. Ein Transplantat wurde erst dann als abgestoßen angesehen, wenn die Glukosewerte wieder anstiegen. Dies ist zweifelsohne eine Simplifizierung des Vorgangs. Zum Zeitpunkt des Wiederanstiegs der Blut-Glukosewerte ist sicherlich bereits der Großteil des Transplantats - egal ob Insel- oder Pankreastransplantat - unwiderbringlich zerstört.

Um die genauere Kinetik der Abstoßung zu untersuchen, müßten sicherlich andere Parameter gesucht werden, zumal wenn der Klinik angenähert, individuell immunsupprimiert werden soll.

Da dies in der vorliegenden Untersuchung nicht der Fall war und auch nicht der Fragestellung entsprach, blieb dieser Gesichtspunkt unberücksichtigt.

Trotzdem wäre es sowohl für Insel- als auch für Pankreas-transplantate wünschenswert, spezifischere Abstoßungsparameter zu finden. Histologische Methoden sind nur bei der experimentellen Pankreastransplantation, nicht jedoch bei Inseltransplantaten zur Abstoßungsdiagnose technisch durchführbar. Der Versuch, die Amylasewerte mit dem Transplantatüberleben zu korrelieren, erwies sich im benutzten Modell nicht als erfolgreich.

Die nach Inseltransplantation durchgeführte MLC erbrachte keine eindeutigen Ergebnisse, die einen Schluß auf eine Transplantattoleranz zuließen. Diese kann jedoch letztlich nicht endgültig ausgeschlossen werden, weil die Methodik der MLC von vielerlei Parametern beeinflußt wird.

So ist z.B. aus anderen Versuchen bekannt, daß der Zeitpunkt nach der Transplantation, an dem die MLC durchgeführt wird, das Ergebnis dieser wesentlich beeinflußt. In einigen Fällen konnte auch in unseren Versuchen ein deutlicher Unterschied im Stimulationsindex festgestellt werden.

Um allerdings diese Unterschiede durch größere Fallzahlen zu verifizieren, und eine Abhängigkeit vom Durchführungszeitpunkt der MLC zu überprüfen, wären weitere, technisch aufwendige und zeitintensive Untersuchungen nötig, die im Rahmen dieser Arbeit nur bedingt durchgeführt werden konnten.

Cyclosporin A wurde nur kurzfristig intramuskulär verabreicht. Die ansonsten in der Literatur angeführte orale Applikation erscheint bei der Ratte problematisch. Auch die intravenöse Infusion ist nur bedingt möglich. Aufgrund guter Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen mit der intramuskulären Verabreichung von Cyclosporin (116) bei Nagern und kleineren Säugern nutzten wir diese Applikationsform.

Beim Menschen zeigt sie in bezug auf die Pharmakokinetik schlechte Ergebnisse (9).

Insgesamt kommen Untersuchungen über die Resorption, Blut-, Gewebespiegel und über die Ausscheidungscharakteristik von Cyclosporin A noch zu relativ unterschiedlichen Ergebnissen. Zusätzlich konnten große interindividuelle Verschiedenheiten aufgezeigt werden.

In der vorliegenden Untersuchung konnten noch 70 Tage nach Transplantation therapeutisch wirksame Cyclosporinspiegel gemessen werden. Dies läßt zumindest die Interpretation zu, daß durch die intramuskuläre Applikation eine Art Depot-effekt erzeugt wird, der für die nötigen Cyclosporin-Spiegel sorgt. Vielleicht lassen sich durch die großen interindividuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik von Cyclosporin auch die relativ großen Unterschiede in der Transplantatüberlebenszeit der Inseltransplantierten Tiere erklären.

In den beschriebenen Experimenten war die pankreas-transplantierte Gruppe als Kontrolle für die Inseltransplantation gedacht. Der dabei bewußt offengelassene ductus pancreaticus hat sicher Einfluß auf die Ergebnisse der Pankreas-transplantation. Andere Verfahren wurden in Vorversuchen ausprobiert, zeigten aber für unsere Zwecke keine Vorteile oder waren technisch zu aufwendig.

Die Pankreastransplantation erscheint vom Gesichtspunkt der technischen Durchführung standardisierbarer als die Inseltransplantation. Den größten Einfluß auf das Pankreas-Transplantatüberleben hatte die technische Qualität der Anastomosen. Hier konnte meist der Grund für ein nicht erfolgreiches Pankreastransplantat gefunden werden.

Die Inselisolationsmethode wird im Teil Diskussion der Ergebnisse erörtert.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen im Gegensatz zur bisherigen Literatur erstmals eine Verlängerung der Inseltransplantatüberlebenszeit durch Cyclosporin A, wenn die Transplantation über eine "major histoincompatibility" Barriere durchgeführt wird. Die Ergebnisse der als Kontrollgruppe durchgeführten Pankreas-Transplantate im selben Modell ergeben Transplantatüberlebenszeiten bzw. Verlängerungen der Transplantatüberlebenszeiten mit Cyclosporin A, die denen der Literatur entsprechen.

Lediglich Vialettes (166) konnte bisher ebenfalls über eine Transplantatüberlebenszeitverlängerung mit Cyclosporin A in einem MHC-Modell (ACI --- DA) berichten. Sie konnte das Transplantatüberleben bis auf ca. 60 Tage verlängern. Interessanterweise vermied auch sie in ihren Versuchen einen Dichtegradienten mit Ficoll, wie er üblicherweise zur Inselisolation verwendet wird.

Bereits Lacy (92) hatte erkannt, daß die Dichtegradientenzentrifugation Einfluß auf die funktionelle Integrität von

Inselzellen hat. Zudem wäre aber denkbar, daß neben der inkretorischen Leistungsfähigkeit auch die Immunogenität der Inselzellen durch den Isolationsvorgang geändert wird.

Es kann nicht ganz ausgeschlossen werden, daß Collagenase oder auch Ficoll die Oberflächenantigene von Inseln ändern, und somit die Inseln einer Abstoßung eher zugänglich gemacht werden. Vor dem Hintergrund dieser Tatsache erscheint es umso klarer, daß der möglichst schonenden Inselisolation eine wichtige Bedeutung für Transplantationsexperimente zukommt.

Leider gibt es bisher nur wenige in ihren Ergebnissen eindeutige Arbeiten, die die morphologischen und funktionellen Veränderungen von Inselzellen während des Isolationsprozesses untersuchen.

Bereits im theoretischen Teil wurde die Bedeutung der "passenger leukocytes" für ein Transplantatüberleben erörtert. Viele Arbeiten bieten Hinweise dafür, daß durch die mittransplantierten immunkompetenten Zellen die Abstoßung maßgeblich beeinflußt wird. Am deutlichsten zeigten dies die Arbeiten von Selawry (145), die ohne Rücksicht auf Histoinkompatibilitätsbarrieren Langzeitinseletransplantatüberleben nach Inselkultur zeigen konnte.

Für diese Kulturen wird postuliert, daß sie zur Verminderung von Leukozyten im Transplantat führen. Hierbei erscheinen jedoch zwei Punkte problematisch: Zum einen ist es bis zu einem gewissen Grad unlogisch, diese "passenger leukocytes" für das kurzzeitige Inseltransplantatüberleben und das Versagen der Immunsuppression verantwortlich zu machen, gleichzeitig jedoch zu erkennen, daß diese Immunsuppression bei Pankreastretransplantaten, die weitaus mehr dieser Zellen enthalten, durchaus wirksam ist und sich auch bessere

Transplantatüberlebenszeiten erzielen lassen.

Zum anderen wird immer wieder in der Literatur die Bedeutung der "passenger leukocytes" in dem Transplantatgewebe selbst betont. Dabei bleibt die Verunreinigung der Transplantatpräparation mit immunkompetenten Zellen (z.B. kleine Lymphknoten), die sich nicht im eigentlichen Inselgewebe befinden, ungeklärt.

Vom quantitativen Gesichtspunkt aus wäre also auch die weitgehende Befreiung der Transplantatpräparation von diesen lymphatischen Verunreinigungen für ein längerfristiges Transplantatüberleben sehr wichtig.

Diese Säuberung der Transplantatpräparation gelingt durch die in dieser Arbeit angewendete und entwickelte Isolations-technik recht gut. Sicherlich läßt sich mit Inselzellkulturen ein noch größerer Grad an Reinheit von lymphatischen Komponenten erreichen. Doch konnten wir in unseren Versuchen sehen, daß jede Kultur negativen Einfluß auf die Vitalität und Ausbeute der Inseln hatte.

Zumindest konnte durch die Neutralrot-Perfusion die Verwechslung der Inseln mit kleinen Lymphknoten, die auch andere Autoren (45) für die Transplantatabstoßung als wichtig erachten, weitgehend ausgeschlossen werden. Zusätzlich erwies sich die selektive Rotfärbung der Inseln als vorteilhaft für die Beurteilung des Grades der Collagenaseverdauung.

Im Stereoauflichtmikroskop ist deutlich zu erkennen, ob noch ungefärbte Zellverbände an den Inseln haften, bzw. ob die Insel selbst bereits angedaut oder fragmentiert ist. Durch dieses Verfahren konnte das Stoppen der Verdauungsin-
kubation optimiert werden.

Schließlich bietet die Neutralrotmethode den Vorteil, die Ausbeute gegenüber in der Literatur beschriebenen und von uns ausprobierten Techniken zu verbessern. Dies ist vor allen Dingen darauf zurückzuführen, daß das Picken der Inseln nicht nur in einem bestimmten Bereich (Interface der Dichtegradientenzentrifugation) geschieht, sondern die gesamte Präparation durchgemustert wird.

Neben der möglichst großen Reinheit der Transplantatpräparation spielt auch die immunsuppressive Medikation eine wichtige Rolle für die vorgelegten Ergebnisse. Cyclosporin A konnte bereits bei Inseltransplantationen über eine "minor histoincompatibility" hinweg Verbesserungen in der Transplantatüberlebenszeit bewirken (135).

Unverständlicherweise konnten diese Effekte bei Transplantationen über eine "major" Histoinkompatibilitätsbarriere nicht wiederholt werden. Aufgrund der vorliegenden Literatur muß jedoch davon ausgegangen werden, daß Cyclosporin A prinzipiell das Transplantatüberleben von Inselzellen verlängern kann.

Bei den bisherigen Untersuchungen wurde Cyclosporin A stets oral oder intravenös appliziert. Beide Applikationsformen bieten Probleme. Ob die von uns gewählte intramuskuläre Applikationsweise einen wesentlichen Anteil an der Verbesserung der Ergebnisse hat, kann nicht beurteilt werden. Die verwendete Dosis ist relativ hoch im Vergleich zu den bisherigen Literaturangaben.

Wir beobachteten jedoch keine auffälligen Toxizitätserscheinungen. Stichprobenweise durchgeführte Kreatininbestimmungen waren stets im oberen Normbereich.

Abschließend kann gesagt werden, daß die hier erstmals gefundene Inseltransplantatüberlebenszeit Verbesserung in einem stark histoinkompatiblen System wohl auf die Kombination von den beiden angeführten Mechanismen zurückzuführen ist:

Einerseits die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin A und zum anderen die durch das entwickelte Isolationsverfahren garantierte Reinheit der Transplantatpräparation.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) ALDERSON, O., FARNDON J.R., ALBERTI K.G.M.M.:
Islet transplantation corrects disordered lipid
metabolism of diabetes in dogs
Transpl. Proc. 17/1: 388 (1985).

- (2) AMAMOO D.G., WOODS J.E., HALLEY K.E.:
Evect of intrahepatically implanted islets of
Langerhans on hepatic function in the rat.
Mayo Clin. Proc. 50: 416 (1975).

- (3) BALLINGER W.F., LACY P.E.:
Transplantation of intact pancreatic islets in
rats.
Surgery 72: 175 (1972)

- (4) BANDLIEN K.O., TOLEDO PEREYRA L.H., AMIEL J.A.,
GORDON D.A., MACKENZIE G.H.:
Improvement of islet cell allograft survival
by renal subcapsular implantation.
Transpl.Proc. 17(1): 391 (1985).

- (5) BAUMGARTNER D., SUTHERLAND D.E.R., HEIL J., NA JARIAN
J.S.:
Long term canine segmental pancreas transplants
with duct left open, neoprene injected duct and
pancreaticoureterostomy. A comparative study.
Transpl.Proc. 13:812 (1981).

- (6) BELL R.N., FERNANDEZ-CRUZ L., BRIMM J., LEE S.,
SAYERS H., ORLOFF M.J.:
Prevention of glomerular basement membrane
thickening in alloxan diabetes
Surgery 88: 31 (1980).

- (7) BENSLEY R.R.:
Studies on the pancreas of the guinea pig.
Am.J.Anat. 3: 297 (1912).
- (8) BERSANI G., ZANC P., PADORAN D., BETTERLE C.:
Lymphocyt subpopulation in insulin dependent
Diabetes mellitus with and without serum islet
cell autoantibodies.
Diabetologia 20: 47 (1981).
- (9) BEVERIDGE T.:
Pharmacokinetics and metabolism of Cyclosporin
A in: White D.G.J. (Hrsg.), Cyclosporin A
Elsevier Biomedical Press, Amsterdam-New York-
Oxford: 35 (1982).
- (10) BEWICK M., MUNDY A.R., EATON B.:
Aspects of the endocrine function of heterotopic
pancreatic allografts in dogs.
Morm.Met.Res.Suppl. 12: 19 (1980).
- (11) BEWICK M., MUNDY A.R., EATON B., WATSON F.:
The endocrine function of heterotopic pancreatic
allotransplants in dogs: III. The cause of
hyperinsulinemia.
Transplantation 31: 23 (1981)
- (12) BILLINGHAM R., SILVERS W.:
zitiert nach: Farbras G., Pusztai R., Mandi Y.,
Belady Y.: In vitro model for cellular cyto-
toxicity against rat Langerhans Islets.
Transplantation 36: 583 (1983).
- (13) BOBZIEN B., YASUNAMI Y., MAJERCIK M., LACY P.E.,
DAVIE J.M.:
Intratesticular transplants of islet xenografts

- rat to mouse.
Diabetes 32: 213 (1983).
- (14) BOITARD C., DEBRAY-SACHS M., POUPLARD A., ASSAN R.,
HAMBURGER J.:
Lymphocytes from diabetes suppress insulin re-
lease in vitro.
Diabetologia 21: 46 (1981).
- (15) BOREL J.F., FEURER C., GUBLER H.B., STAHLIN H.:
Biological effects of Cyclosporin A: A new
antilymphocytic agent.
Agent and Actions 6: 468 (1976).
- (16) BOREL J.F., LAFFERTY K.J.:
Mechanism of action of Cyclosporin A in vitro
Vortrag beim: 14th Round Table Symposium on
applied immunology Axams Februar 1983 organisiert
von W. Brendel.
- (17) BOTTAZZO G.F., FLORIN-CHRISTENSEN A., DONIACH D.:
Islet cell antibodies in Diabetes mellitus with
autoimmune polyendocrine deficiencies.
Lancet 2: 1279 (1974).
- (18) BOUCHER D.W., NOTKINS A.L.:
Virus induced Diabetes mellitus.
J.Exp.Med. 137: 1226 (1973).
- (19) BOWEN K.M., ANDRUS L., LAFFERTY K.J.:
Successful allotransplantation of mouse pancrea-
tic islets to nonimmunosuppressed recipients.
Diabetes 29 (suppl.): 98 (1980).
- (20) BREKKE J.B., HSTMARK A.T., FLATEN O., OYASOETER S.:
Effect of pancreas transplantation on plasma

lipids and plasma concentrations of pancreatic hormones in streptozotocin diabetic rats.
Eur.Surg.Res. 13: 361 (1981).

- (21) BREKKE J.B., GULLESEN J., REFSUM S.B., FLATHMARK A.:
Long-term endocrine function of duct-ligated pancreas isotransplants in rats.
Eur.Surg.Res. 12: 167 (1980).

- (22) BROLIN S., HELLMANN B.:
New methods for determination of pancreatic islet volume.
Diabetes 12(1): 62 (1963).

- (23) BRONS J.G.M., CALNE R.Y., ROLLES K., OLCZAK S., EVANS D.B.:
Paratopic segmental pancreas with simultaneous kidney transplantation in man.
Vortrag auf dem: 2nd Congress of the European Society for Organ Transplantation, München, November 1985.

- (24) BROWN J., CLARK W.R., MOLNAR G., MULLEN Y.S.:
Fetal pancreas transplantation for reversal of streptozotocin induced Diabetes in rats.
Diabetes 25: 56 (1976).

- (25) BROWN J., DANILOVS J.H., CLARK W.R., MULLEN Y.S.:
Fetal pancreas as a donor organ.
World J. Surg. 8: 152 (1984).

- (26) BRYNGER H., BERMARK J., CLAES G.:
The function of the duct ligated pancreatic allograft.
Eur.Surg.Res. 7: 212 (1975).

- (27) BUITRAGO A., GYLTE E., HENRIKSSON C., PERTOFF H.:
Rapid isolation of pancreatic islets from collagenase digested pancreas by sedimentation through Percoll TM at unit gravity.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 79 (3): 823 (1977).
- (28) BUSCHARD K., ROPKE C., MADSBUD S., MEHLSSEN J., RYGUARD J.:
T-Lymphocytes subsets in patients with newly diagnosed type 1 (insulin dependent) diabetes.
Diabetologia: 25: 247 (1983).
- (29) CATTANEO R., SAIBENE V., POZZA G.:
Peripheral T-lymphocytes in juvenile onset diabetics (JOD) and maternity onset diabetics (MOD).
Diabetes 25: 223 (1976).
- (30) CHAIREZ R., YOON J., NOTKINS A.L.:
Virus induced Diabetes mellitus.
Virolog. 85: 606 (1978).
- (31) DAFOE D.C., NAJI A., BARKER C.F.:
Susceptibility to murine viral diabetes. Host versus intrinsic pancreatic factors.
Transpl.Proc. 13/1: 829 (1981).
- (32) DeJODE L.R., HOWARD J.M.:
Studies in pancreaticoduodenal homotransplantation.
Surg.Gynecol.Obstet 114: 553 (1962).
- (33) DI MARIO U., JUVICOLI M., ANDREANI D.:
Circulating immune complexes in diabetes.
Diabetologia 19: 89 (1980).

- (34) DOBESEN M.J., SCHARFF J.E.:
 Preferential lysis of pancreatic B-cells by islet cell surface antibodies.
 Diabetes 31: 459 (1982).

- (35) DOWNING R., SCHARP D.W., BALLINGER W.F.:
 An improved technique for the isolation and identification of mammalian islets of Langerhans.
 Transplantation 29: 79 (1980).

- (36) DUBERNARD J.M., GELET A., TRAEGER J., MONTI L.,
 PIATTI P.M., MARTIN X., MONQIN-LONG D., HENRIET M., CANTON F., POZZA G.:
 Experience with 59 pancreatic transplants in type 1 diabetic patients.
 Vortrag auf dem: 2nd Congress of the European Society for Organ Transplantation, München, November 1985.

- (37) DUBERNARD J.M., TRAEGER J., NEYRA P., TOURAINE J.L.,
 TRAUDIANT D., BLANC BRUNAT H.:
 A new method of preparation of segmental pancreatic grafts for transplantation.
 Surgery 84: 633 (1978).

- (38) EGGSTEIN, LUFT, VON OLDERSHAUSEN:
 Diabetes mellitus in: Groß Schölmerich (Hrsg.):
 Lehrbuch der Inneren Medizin.
 Schattauer, Stuttgart-New York: 899 (1982).

- (39) FAUSTMANN D.L., HAUPTFELD V., LACY P.E., DAVIE J.M.:
 Prolongation of murine islet allograft survival by pretreatment of islets with antibody directed to Ia determinants.
 Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78: 5156 (1981).

- (40) FAUSTMANN D.L., LACY P.E., DAVIE J.M., HAUPTFELD V.:
Prevention of allograft rejection by immunisation with donor blood depleted of Ia bearing cells.
Science 217: 157 (1982).
- (41) FAUSTMANN D.L., STIMA R.M., GEBEL H.M., HAUPTFELD V.,
DAVIE J.M., LACY P.E.:
Prevention of mouse islet allograft rejection by elimination of intraislet dendritic cells.
Transpl.Proc. 17 (1): 420 (1985).
- (42) FEDERLIN K.F., BRETZEL M.D.:
The effect of islet transplantation on complications in experimental diabetes of the rat.
W.J.Surg. 8: 169 (1984).
- (43) FEDERLIN K., BRETZEL R.G.:
Inseltransplantation. Gegenwärtiger Stand und Perspektiven.
Med.Klin. 76: 720 (1981).
- (44) FESTING M.F.W.:
Standardized nomenclature of inbred strains of rats. Fourth listening.
Transplantation 16: 221 (1973).
- (45) FINKE E.H., LACY D.E., ONO J.:
Use of reflected green light for specific identification of islets in vitro after collagenase isolation.
Diabetes 28: 612 (1979).
- (46) FOULIS A.K., STEWART J.A.:
The pancreas in recent type 1 (insulin dependent) Diabetes mellitus: insulin content of islets,

insulinitis and associates changes in the
Diabetologia 26: 456 (1984).

- (47) GARVEY J.F.W., McSHANE P., POOLE M.D., MILLARD P.R.,
MORRIS P.J.:

The effect of Cyclosporin A on experimental
pancreas allografts in the rat.
Transpl.Proc. 7(2): 260 (1980).

- (48) GARVEY J.F.W., McSHANE P., POOLE M.D., MILLARD P.R.,
MORRIS P.J.:

The effect of Cyclosporin A on experimental
pancreas allografts in the rat.
Transpl. Proc. 12: 266 (1980).

- (49) GEMPTS W., LECOMPTE P.M.:

The pancreatic islets in diabetes.
Amer.J.Med. 70: 105 (1981).

- (50) GIL-VERNET J.M., FERNANDEZ-CRUZ L., ANDREU J.,
FIGUEROLA D., CARALPS A.:

Urinary tract diversion (UTD) in clinical pan-
creas transplantation.
Poster für den: 2nd Congress of the European
Society for Organ Transplantation, München,
November 1985.

- (51) GLIEDMANN M.L., GOLD M., WHIFTAKER J., RIFKIN H.,
SOBERMAN R., FREED S., TELLIS V., VEITH F.J.:

Pancreatic duct to ureter anastomosis in pan-
creatic transplantation.
Am.J.Surg. 125: 245 (1973).

- (52) GORDON M.Y., SINGER J.W.:

Selective effects of Cyclosporin A on colony
forming lymphoid and myeloid cells in man.
Nature 279: 433 (1979).

- (53) GRAY D.W.R., McSHANE M., MORRIS P.J.:
A method for isolation of islets of Langerhans
from the human pancreas.
Transpl.Proc. 17(1): 381 (1985).
- (54) GRAY D.W.R., MORRIS P.J.:
Cyclosporine and pancreas transplantation.
World J.Surg. 8: 230 (1984).
- (55) GRAY B.N., WATKINS E.:
Prolonged relief after syngeneic or allogeneic
transplantation of isolated pancreatic islets
in rats.
Surg.Forum 25: 382 (1974).
- (56) GRIFFITH R.C., SCHARP D.W., HARTMANN B.K., BALLINGER
W.F., LACY P.E.:
A morphologic study of intrahepatic portal vein
islet isografts.
Diabetes 26: 201 (1977).
- (57) GONTER B., STARK O.:
The major histocompatibility system of the rat
in: Göke D. (Hrsg.), The MHS in man and animals.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York:
226 (1977).
- (58) HALBAN P.A., WOLLHEIM C.B., BLONDEL B., MEDA P.,
NIESOR E.N., MINTZ D.:
The possible importance of contact between pan-
creatic islet cells for the control of insulin
release.
Endocrinology 111/1: 86 (1982).

- (59) HARDY M.A., REEMTSMA K., LAU H.T.:
Induction of indefinite rat islet allograft survival with direct ultraviolet irradiation and peritransplant Cyclosporine.
Transpl.Proc. 17(1): 423 (1985).
- (60) HEINECKE A., HULTSCH E., NIENHAUS R., REISCH A.,
WINERT F.:
Biomathematik für Mediziner.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
(1976).
- (61) HELLMANN B.:
The numerical distribution of the islets of Langerhans at different ages of the rat.
Ac.Endocrinol. 32: 63 (1959).
- (62) HELMKE K., BROCKHAUS R., OTTEN A., WILLEMS W.,
FEDERLIN K.:
Viruses in the pathogenesis of type I Diabetes.
Workshop on Immunology and Diabetes.
Luxemburg (April 1982).
- (63) HELMKE K., SEITZ M., BROCKHAUS R., WEIMER R., OTTEN
A., FEDERLIN K.:
Autoimmunphänomene beim Diabetes mellitus.
Immun.Infekt 11: 199 (1983).
- (64) HELMKE K., VELOUSKY H.G.:
Immunphänomene beim Diabetes mellitus.
Krankenhausarzt 56: 2 (1983).
- (65) HENRIKSSON C.:
Isolation and transplantation of islets of Langerhans.
Acta Chir.Scand. 483 (Supl.): 5 (1978).

- (66) HENRIKSSON C., BERGMARK J., CLAES G.:
Metabolic response to isologous transplantation
of small numbers of isolated islets of Langer-
hans in the rat.
Eur.Surg.Res. 9: 411 (1977).
- (67) HESS W.N., ROOT K.W.:
Study of the pancreas of white rats of different
age groups.
Amer.J.Anat. 63: 489 (1938).
- (68) HOROGUCHI A., MERELL R.C.:
Preparation of viable islet cells from dogs
by a new method.
Diabetes 30: 455 (1981).
- (69) HUANG S.W., TAYLOR G.E.:
Immuninsulinitis and antibodies to nucleic acids
induced with streptozotocin in mice.
Clin.Exp.Immunol. 43: 425 (1981).
- (70) HUBER W., KOLB E., UHLSCHMID G.K., LARGADIER F.:
Destruction of exocrine pancreatic tissue by
use of seleno-DL-methionin for islet cell se-
paration.
Transpl.Proc. 17(1): 412 (1985).
- (71) JACKSON R.A., MORRIS M.A., HAYNES B., EISENBARTH G.S.:
Increased circulating Ia antigen bearing T-cells
in type 1 Diabetes mellitus.
N.Enql.J.Med. 306: 785 (1982).
- (72) JENSON A.B., ROSENBERG H.S., NOTKINS A.L.:
Pancreas islet cell damage in children with
fatal virus infections.
Lancet 2: 354 (1980).

- (73) JOLLEY W.B., KNIERIM K., HINSHAW D.B., HAM J.M.:
Successful allografts of pancreatic islets in
diabetic recipients after donor-specific blood
transfusion and antilymphocyte serum treatment.
Transpl.Proc. 14(2): 413 (1982).
- (74) JOUNOD A., LAMBERT A.E., STAUFFACHER W., RENOLD
A.E.:
Diabetic action of streptozotocin.
Relationship of dose to metabolic response.
J.of Clin.Invest. 48: 1969 (1969).
- (75) KASTAKIS A.J., WHITE D.J.G., CALNE R.Y.:
Prolongation of the rat heart allograft sur-
vival by Cyclosporin A.
JCRS Med.Sci. 5: 280 (1977).
- (76) KELDANY A.:
Autoantibodies to islet cells in Diabetes melli-
tus.
Diabetes 28: 102 (1979).
- (77) KEMP C.A., KNIGHT M.J., SCHARP D.W., BALLINGER W.F.,
LACY P.E.:
Effect of transplantation site on the results
of pancreatic islet isografts in diabetic rats.
Diabetologia 9: 486 (1973).
- (78) KEMP C.B., KNIGHT M.J., SCHARP D.W., LACY P.E.,
BALLINGER W.F.:
Transplantation of isolated pancreatic islets
into the portal vein of diabetic rats.
Nature 244: 447 (1973).

- (79) KENNEDY L., BAYNES J.W.:
Non enzymatic glycosilation and the chronic complications of diabetes. An overview.
Diabetologia 26: 93 (1984).
- (80) KIEF H.:
Diabetes mellitus. in: Rotter W. (Hrsg.):
Lehrbuch der Pathologie Band II.
Schattauer Stuttgart-New York: 294 (1978).
- (81) KLEMPNAUER J., STEINIGER B., LUECK R., BRUSCH U.,
PICHELMAYER R.:
Impact of different surgical techniques on graft morphology and endocrine function following vascularised rat pancreas transplantation.
Poster für den: 2nd Congress of the European Society for Organ Transplantation, München, November 1985.
- (82) KÖNIGSBERGER H.:
Inaugural Dissertation, LMU München, im Druck.
- (83) KOLB U.:
Persönliche Mitteilung bei einem Vortrag im Institut für Immunologie der LMU München, Dezember 1985.
- (84) KRAMP R.C., LONGDON C.C., SMITH L.H.:
Isogeneic and allogeneic transplantation of duct-ligated pancreas in streptozotocin diabetic mice.
Eur.J.Clin.Invest.5: 249 (1975).
- (85) KRETSCHMER G.J., SUTHERLAND D.E.R., MATAS A.J.,
CAIN T.L., NAJARIAN J.S.:

The dispersed pancreas without islet purification in totally pancreatectomized dogs.
Diabetologia 13: 495 (1977).

- (86) KRUIPIN T., WALTMAN S.R., SHARP D.W., OESTRICH C.,
FELDMANN, S.D., BECKER B., BALLINGER W.F.,
LACY P.E.:

Ocular fluorophotometry in streptozotocin diabetes mellitus in the rat. Effect of pancreatic islet isografts.
Invest.Ophthalmol.Visual Sci. 18: 1184 (1979).

- (87) KYRIAKIDES G.K., RABINOVITCH A., MINTZ D., OLSON L.,
RAPAPAPORT F.T., MILLER J.:

Long term study of vascularised free draining intraperitoneal pancreatic segmental allografts in beagle dogs.
J.Clin.Invest. 67: 292 (1981).

- (88) LACY P.E.:

Workshop on pancreatic islets cell transplantation in diabetes.
Diabetes 27: 427 (1978).

- (89) LACY P.E.:

Experimental Immunoalteration.
World J. Surg. 8: 189 (1985).

- (90) LACY P.E., DAVIE J.M., FINKE E.H.:

Induction of rejection of successful allografts of rat islets by donor peritoneal exsudate cells.
Transplantation 28: 415 (1979).

- (91) LACY P.E., DAVIE J.M., FINKE E.H.:

Prolongation of islet allograft survival following

in vitro culture and a single injection of ALS
Science 204: 312 (1979).

- (92) LACY P.E., KOSTIANOVSKY M.:
Method for the isolation of intact islets of
Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16: 35 (1967).
- (93) LACY P.E., LACY E.T., FINKE E.H., YASUNAMI Y.:
An improved method for the isolation of islets
from the beef pancreas.
Diabetes 31 Suppl. 4: 109 (1982).
- (94) LACY P.E., WALKER M.M., FINK C.E.J.:
Perifusion of isolated rat islets in vitro.
Diabetes 21: 987 (1972).
- (95) LAFFERTY K.J.:
Lymphocytenreaktivität.
Sandorama 2: 24 (1983).
- (96) LAFFERTY K.J., PROWSE S.J.:
Theory and practice of immunoregulation by tissue
treatment prior to transplantation.
World J.Surg. 8: 187 (1984).
- (97) LAFFERTY K.J., WOOLROUGH J.:
The origin and mechanism of the allograft re-
jection.
Immunol.Rev. 35: 231 (1977).
- (98) LANDGRAF R.:
Persönliche Mitteilung auf dem 2. Congress der
European Society for Organ Transplantation in
München, November 1985.

- (99) LANDGRAF R., LANDGRAF LEURS M.M.C., BURG D., KAMPIK A., CASTRO L.A., ABENDROTH A., ILLNER W.D., LAND W.:
Long-term follow-up of segmental pancreas transplantation in type 1 diabetics.
Vortrag auf dem: 2nd Congress of the European Society for Organ Transplantation, München, November 1985.
- (100) LARGADIER E., KOLB E., BINSWANGER U.:
A long term functioning human pancreatic islet allotransplant.
Transplantation 39: 76 (1980).
- (101) LAU H., REEMTSMA K., HARDY M.A.:
Pancreatic islet allograft prolongation by donor specific blood transfusions pretreated with ultraviolet irradiation.
Science 221: 754 (1983).
- (102) LAU C.T., SUTHERLAND D.E.R., PAYNE W.D., BORECKI P.:
Prolongation of mouse and rat pancreatic islet cell allografts by adenosine deaminase inhibitors and adenine arabinoside.
J.Surg.Res. 28: 44 (1980).
- (103) LEE S., TUNG K.S.K., KOOPMANN H., CHANDLER J.G., ORLOFF M.J.:
Pancreaticoduodenal transplantation in the rat
Transplantation 13 (4): 421 (1972).
- (104) LERNMARK A., FREEDMAN Z.R., HOFMANN C., RUBENSTEIN A.H., STEINER D.F., JACKSON R.L., WINTER R.J., TRAISMAN H.S.:
Islet-cell-surface-antibodies in juvenile Diabetes mellitus.

N. Engl. J. Med. 299 (8): 375 (1978).

- (105) LERNMARK A., SEHLIN J., TÄLJEDAHL B., KROMANN H.,
NERUP J.:

Possible toxic effect of normal and diabetic
patient serum on pancreatic B-cells.
Diabetologia 14: 25 (1978).

- (106) LILLEHEI R.C., SIMMONS R.L., NAJARIAN J.S., WEIL R
III., UCHIDA H., RUIZ J.O., KJELLSTRAND C.M.,
GOETZ F.C.:

Pancreaticoduodenal allotransplantation.
Experimental and clinical experience.
Ann.Surg. 172: 405 (1970).

- (107) LIU T., SUTHERLAND D.E.R., HEIL J., DUNNING M.,
NAJARIAN J.S.:

Beneficial effect of establishing pancreatic
duct drainage into a hollow organ (bladder, je-
junum or stomach) compared to free intraperi-
toneal drainage or duct injection.
Transpl.Proc. 17 (1): 366 (1985).

- (108) MARNER B., LERNMARK A., NERUP J., MOLENAAR J.L.,
BRUINING G.J.:

Analysis of islet cell antibodies on frozen sec-
tions of human pancreas.
Diabetologia 25: 93 (1983).

- (109) MATAS A.J., SUTHERLAND D.E.R., STETTES M.W., NAJARIAN
J.S.:

Islettransplantation.
Surg.Gynecol.Obstet. 145: 757 (1977).

- (110) MEHIGAN D.G., BALL W.R., ZUDEMA G.D., EGGLESTON J.G.,
CAMERON J.L.:

Disseminated intravascular coagulation and portal hypertension following pancreatic islet transplantation.

Ann.Surg. 191: 287 (1980).

(111) V.MEYENBURG H.:

Über die Insulininitis beim Diabetes.

Schweiz.Med.Wschr. 70: 554 (1940).

(112) MIRKOVITCH V., CAMPICHE M.:

Intrasplenic autotransplantation of canine pancreatic tissues. Maintenance of normoglycaemia after total pancreatectomy.

Eur.Surg.Res. 9: 173 (1977).

(113) MORRIS P.J.:

Cyclosporin A.

Transplantation 32 (5): 349 (1981).

(114) MOSKALEWSKI S.:

Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig.

Gen.Comp.Endocrinol. 5: 342 (1965).

(115) NASH J.R., BELL P.R.:

Effect of macrophage suppression on the survival of islet allografts.

Transpl.Proc. 11: 986 (1979).

(116) NATHRATH W.B.J., WILSON P.D., TREJOSIEWICZ L.K.:

Immunohistochemical demonstration of epithelial and urothelial antigens at light and electron-microscope levels.

Acta Histochem. 25 (Suppl): 73 (1982).

- (117) NATIONAL DIABETES DATA GROUP:
Classification of Diabetes mellitus and other
categories of glucose intolerance.
Diabetes 28: 1039 (1980).
- (118) NERUP J., LERNMARK A.:
Autoimmunity in insulin dependent Diabetes
mellitus.
Amer.J.Med. 70: 135 (1981).
- (119) NOEL J., RABINOVITCH A., OLSON L., KYRIAKIDES G.,
MILLER J., MINTZ D.:
A method for large scale, high yield isolation
of canine pancreatic islets of Langerhans.
Metabolism 31(2): 184 (1982).
- (120) NOLAN M.S., LINDSEY N.J., SAVAS C.D., HEROLD A.,
BECK S., SLATER D.N., FOX M.:
Pancreatic transplantation in the rat. Long
term study following different management of
exocrine drainage.
Transplantation 36(1): 26 (1983).
- (121) NORBERG A.:
A method for the microdissection of intact pan-
creatic islets of mammals.
Acta Endocrinol. 45: 122 (1964)
Zitiert nach: Downing R.: Historical review of
pancreatic islet transplantation.
World J.Surg. 8: 137 (1984).
- (122) ORLOFF M.J., LEE S., BLOOR C.M., WORTHEN D.M.,
SAYERS H.J.:
Preventing of kidney and eye lesions of
alloxan diabetes by pancreas transplantation.
Diabetes 27 (Suppl) 2: 446 (1978).

- (123) ORLOFF M.J., LEE S., CHARTERS A.C., GRAMBORT D.E.,
STORCK L.G., KNOX D.:
Long term studies of pancreas transplantation
in Diabetes mellitus.
Vortrag beim: Annual Meeting of the American
Surgical Association.
Quebec City Mai 1975.
- (124) ORLOFF M.J., LEE S., CHARTERS H.S., GAMBERT D.E.,
STORCK L.G., KNOX D.:
Long term studies of pancreas transplantation
in experimental Diabetes mellitus.
Ann.Surg.182: 259 (1975).
- (125) PALACIOS R., MÖLLER G.:
Cyclosporin A blocks receptors for HLA DR anti-
gens on T cells.
Nature 290: 792 (1981)
- (126) PALM J.:
Immunogenetic analysis of AgB histocompatibility
antigens in the rat.
Transplantation 11: 175 (1971).
- (127) PARR E.L.:
The absence of H2 antigens from mouse pancrea-
tic B-cells demonstrated by immunoferritin la-
belling.
J.Exp.Med. 150: 1 (1979).
- (128) POZZILLI P., JUCCARINI O., JUVIC O., LI M., ANDREANI
P., SENSI M., SPENCER K.M., BOTTAZZO G.F.,
BEVERLEY P.C.L., KYNER J.L., CUDWORTH A.G.:
Monoclonal antibodies defined abnormalities of

T-lymphocytes in type 1 (insulin dependent)
diabetes.

Diabetes 32: 91 (1983).

- (129) POZZILLI P., SENSI M., GORUCH A., BOTTAZZO G.F.,
CUDWORTH A.G.:

Evidence for raised K-cell Levels in type 1
diabetes.

Lancet 9: 173 (1979).

- (130) RAMSEIER H., PALM J.:

Further studies of the histocompatibility loci
in rats.

Transplantation 5: 721 (1967).

- (131) REECE-SMITH H., DuTOIT D.F., McSHANE P., MORRIS P.J.:

Prolonged survival of pancreatic islets allo-
grafts transplanted beneath the renal capsule.

Transplantation 31: 305 (1981).

- (132) REECE-SMITH H., HOMAN W.P., DuTOIT D.F., McSHANE P.,
MORRIS P.J.:

A technique for transplanting pancreatic is-
lets as a vascularised graft and prevention of
rejection with Cyclosporin A.

Transplantation 31 (6): 442 (1981).

- (133) RITTENHOUSE H.G., OXENDER D.L., PEK S., AR D.:

Complement mediated cytotoxic effects on pan-
creatic islets with sera from diabetic patients.

Diabetes 29: 312 (1980).

- (134) ROSS M.E., ONODERAT T., BROWN K.S., NOTKINS A.L.:

Virus induced Diabetes mellitus.

Diabetes 25: 190 (1976).

- (135) RYNASIEWICZ J.J., SUTHERLAND D.E.R., FERGUSON R.M.,
SOUIFFLET J.P., MORROW CH.E., GOETZ F.C., NAJARIAN J.S.:
Cyclosporin A for Immunosuppression: Observation
in rat heart, pancreas and islet allograft models and in human renal and pancreas transplantation.
Diabetes 31 (Suppl.) 4: 92 (1982).
- (136) RYNASIEWICZ J., SUTHERLAND D.E.R., KAWAHARA K.,
GORECKI P., NAJARIAN J.S.:
Cyclosporin A prolongation of segmental pancreas
and islet allograft function in rats.
Transpl.Proc. 12: 270 (1980).
- (137) SATAKE K., NOWYGRAD R., OLUWOL S., TODD G.J.,
HARDY M.A., REEMTSMA K.:
Free duct pancreatic transplantation in rats.
Surg.Forum 30: 308 (1979).
- (138) SAVE K.H., BITTER-SUERMAN H., SODERBERGH J.:
Morphological findings in duct-ligated pancreas
grafts in the rat.
- (139) SCHANG T., TIMMERMANN W., TIEDE A.:
Influence of the technique for pancreatic transplantation on long term function and the course of rejection.
Vortrag auf dem: 2nd Congress of the European
Society for Organ Transplantation, München,
November 1985.
- (140) SCHARP D.W.:
Islet transplantation.
World J.Surg. 8: 143 (1984).

- (141) SCHARP D.W., MASON N.S., SPARKS R.E.:
Islet immuno-isolation: The use of hybrid artificial organs to prevent islet tissue rejection.
World J.Surg. 8: 221 (1984).
- (142) SCHMIDT M.B.:
Über die Beziehung der Langerhans'schen Inseln des Pancreas zum Diabetes mellitus.
MMW 49: 5 (1902).
- (143) SCHMIDT T.:
Die ortotopie Lebertransplantation bei der Ratte.
Inauguraldissertation LMU München (1984).
- (144) SCHULAK J.A., FRANKLIN W., RECKARD C.R.:
Morphological and functional changes following intraportal islet allograft rejection.
Irreversibility with steroid pulse therapy.
Surg.Forum 28: 296 (1977).
- (145) SELAWRY H.P., MUI M.M., PAUL R.D., DISTASIO J.A.:
Improved allograft survival using highly enriched populations of rat islets.
Transplantation 37(2): 202 (1984).
- (146) SQUIFFLET J.P., SUTHERLAND D.E.R., FLORACK G., NAJARIAN J.S.:
Pancreatic Transplantation in the rat. Long-term study following different methods of management of exocrine drainage.
Poster für den: 2nd Congress of the European Society for Organ Transplantation.
München, November 1985.
- (147) STEINIGER B., KLEMPNAUER J., WONIGEIT K.:

Effect of the rejection process on class I and class II major histoincompatibility complex antigen expression in the rat pancreas.
Transpl.Proc. 17(1): 407 (1985).

- (148) STILLER C.R., DUPRE J., GENT M., JENNER M.R.,
KEOWN P.A., LAUPACIS A., MARTELL R., RODGER
N.W., v.GRAFTENRIED B., WOLFE B.M.J.V.:
Effects of Cyclosporine immunosuppression in in-
sulin dependent Diabetes mellitus.
Lancet 1/8: 10 (1983).
- (149) STRUBBE J.H.:
Effect of pancreas transplantation on insulin
secretion on the rat during injection of varying
glucose loads.
Diabetologia 22: 354 (1982).
- (150) SUTHERLAND D.E.R.:
Pancreas and islet transplantation.
I. Experimental studies.
Diabetologia 20: 161 (1981).
- (151) SUTHERLAND D.E.R.:
Pancreas and islet transplant registry data.
World J.Surg. 8: 270 (1984).
- (152) SUTHERLAND D.E.R., CHINN P.L., GOETZ F.C., ELICK
B.A., NAJARIAN J.S.:
Minnesota experience with 85 pancreas trans-
plants between 1978 and 1983.
World J.Surg. 8: 244 (1984).
- (153) SUTHERLAND D.E.R., GOETZ F.C., NAJARIAN J.S.:
Intraperitoneal transplantation of immediately

vascularised segmental pancreas grafts without duct ligation. A clinical trial.
Transplantation 28: 485 (1979).

- (154) TOLEDO-PEREYRA L.H., CASTELLANOS J.:
Role of pancreatic duct ligation for segmental pancreas autotransplantation.
Transplantation 28: 469 (1979).
- (155) TOLEDO-PEREYRA L.H., CASTELLANOS J., LAMPE E.W.,
LILLEHEI R.C., NAJARIAN J.S.:
Comparative evaluation of pancreas transplantation techniques.
Ann.Surg.182: 567 (1975).
- (156) TOLEDO-PEREYRA L.H., CASTELLANOS J., MANIFICIO G.,
LILLEHEI R.C.:
Basic requirements of pancreatic mass for transplantation.
Arch.Surg. 114: 1058 (1979).
- (157) TRAEGER J., DUBERNARD J.M., POZZA G., SECCHI A.,
BOSI E., PONTIROLI A.E., GELET A., MARTIN X.,
TOURAINÉ J.L.:
Functional studies of insulin secretion pattern following segmental neoprene injected pancreatic allograft in insulin dependent (type 1) diabetic recipients.
Horm.Met.Res.Suppl. 13: 63 (1983).
- (158) TRAEGER J., DUBERNARD J.M., RUITTON C., MALIK M.C.,
TOURAINÉ J.L.:
Function of 15 pancreatic allografts in man.
Transpl.Proc. 13: 299 (1981).

- (159) TRAVERSO L.W., ALOU U., ZAMZAM, LONGMIRE W.P.:
Human pancreatic cell autotransplantation following total pancreatectomy.
Ann.Surg.193: 191 (1981).
- (160) TYDEN G., LUNDGREN G., ØST L., ENGFELDT P.,
GUNNARSSON R., ØSTMAN J., GROTH G.:
Improved results with pancreatic transplantation with enteric exocrine diversion.
Vortrag auf dem: 2nd Congress of the European Society for Organ Transplantation, München, November 1985.
- (161) TZE W.J., TAI J.:
Successful intracerebral allotransplantation of purified pancreatic endocrine cells in diabetic rats.
Diabetes 32: 1185 (1983).
- (162) TZE W.J., WONG F.C., TINGLE A.J.:
The use of hypopaque ficoll in the isolation of pancreatic islets in rats.
Transplantation 22: 201 (1976).
- (163) VERSCHOOR L., HULSMANN H.A.M., DeGRAYL J., WEST-BROEK D.L., MacDICKEN J.:
Endocrine function of the canine pancreas. The effect of duct ligation and transplantation of the total duct ligated pancreas.
Acta Endocrinol. 80: 302 (1975).
- (164) VALENTE U., FERRO M., CAMPISI C., CATALDI L.,
TRAVERSO C., FONTANA I., DeROSA E., CAMA A.,
TOSCATTI E.:
Report of clinical cases of islet autotransplantation.

Transpl.Proc. 12 (Suppl.2): 202 (1980).

- (165) VIALETES B., LASSMANN V., VAGRE P., SIMON M.C.:
Islet transplantation in diabetic rats.
Long term follow up of glucose tolerance.
Acta.Diabetol.Lat. 16: 1 (1979).

- (166) VIALETES B., SIMON M.C., LASSMANN V., VAQUE P.:
Prolonged survival of allotransplanted islets
of Langerhans after Cyclosporin A treatment in
rats.
Transplantation 28: 435 (1979).

- (167) VIALETES B., SUTHERLAND D.E.R., MATAS A.J., PAYNE
W.D., NAJARIAN J.S.:
Amelioration of streptozotocin induced diabetes
in rats: Effect of islet isografts on plasma
lipids and other metabolic abnormalities according
to donor source and site of transplantation.
Metabolism 28: 489 (1979).

- (168) VIALETES B., SUTHERLAND D.E.R., PAYNE W.A., MATAS
A.J., NAJARIAN J.S.:
Synergistic effect of donor specific soluble
membran antigen injection and antilymphocyte
globulin administration on the survival of allo-
grafts in rats.
Transplantation 25: 336 (1978).

- (169) WAGNER H.:
The immunosuppressive effects of Cyclosporin A in
vitro cytotoxic allograft responses.
Vortrag beim: 12th Round Table Symposium on
applied immunology Axams, Februar 1981, organi-
siert von W. Brendel.

- (170) WARNOCK G.L., RAJOTTE R.V., PROCYSHYN A.W.:
 Normoglycaemia after reflux of islet containing
 pancreatic fragments into the splenic vascular
 bed in dogs.
 Diabetes 32: 452 (1983).
- (171) WEST K.M.:
 Hyperglycaemia as a cause of longterm compli-
 cations in Keen H., Jarrett R.J. (Hrsg.): Compli-
 cations of diabetes, Arnold, London: 13 (1982).
- (172) WHITE D.J.G. (Ed.):
 Cyclosporin A.
 Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York,
 Oxford (1982).
- (173) WIJFFELS R.T.M., VAN GOOR H., SLUITER W.J., SLOFT,
 M.J.H.:
 Beta-cell response and insulin sensitivity after
 segmental pancreatic autotransplantation with
 venous systemic drainage.
 Vortrag auf dem: 2nd Congress of the European
 Society for Organ Transplantation, München,
 November 1985.
- (174) WOLFF H., LORENZ D., LIPPERT H.:
 Der gegenwärtige Stand der Pancreasinsel-
 transplantation.
 Dtsch.Med.Wschr. 106: 506 (1981).
- (175) YOON J., AUSTIN M., ONODERAT T., NOTKINS A.L.:
 Virus induced Diabetes mellitus. Isolation of
 a virus from the pancreas of a child died with
 ketoacidosis.
 N.Engl.J.Med. 300 (21): 1173 (1979).

- (176) ZIEGLER M.M., RECKARD C.R., BARKER C.F.:
Long term metabolic and immunological consider in transplantation of pancreatic islets.
J.Surg.Res. 16: 575 (1974).

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. mult.hc. W. Brendel danke ich für die Aufnahme ins Institut und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. B.U. von Specht für die verlässliche Betreuung bei der Arbeit.

Herrn PD Dr. Paul Walter von der Chirurgischen Universitätsklinik Homburg gilt man Dank für die gute Zusammenarbeit.

Herrn PD Dr. W. Permanetter vom Pathologischen Institut danke ich für die Anfertigung und Diskussion der histologischen Präparate. Hier sei auch Frl. Vaupel gedankt.

Herrn PD. Dr. Teichmann (Chirurgische Universitätsklinik) und Herrn Prof. Dr. Vogt und der jeweiligen Laborbesatzung gilt mein Dank für die Insulin- und Glukosebestimmungen.

Schließlich sage ich unserem ganzen Labor und hier vor allem Frl. Ursula Schwarz und meinem Mitdoktoranden Harald Königsberger ein herzliches Dankeschön für die gewährte Hilfe und die gute Zusammenarbeit.

L E B E N S L A U F

- 23.10.1959 Geburt als erstes von drei Kindern
Vater: Prof. Ulrich Dibelius
Mutter: Barbara Dibelius
- Sept. 1966 Eintritt in die Volksschule
München-Aubing
- Febr. 1967 Umschulung in die Grundschule Gauting
- Sept. 1970 Übertritt in das Otto-von-Taube
Gymnasium Gauting
- Mai 1979 Abitur
- Nov. 1979 Beginn des Medizinstudiums an der
LMU München
Seither Stipendiat der Bayerischen
Begabtenförderung
- März 1980 Aufnahme in die Studienstiftung des
Deutschen Volkes.
Stipendiat bis zum Studienende.
- Aug. 1981 Ärztliche Vorprüfung
- Aug. 1982 1. Teil der Ärztlichen Prüfung
- Sept. 1982 Beginn der Doktorarbeit am Institut
für Chirurgische Forschung
- Aug. 1983 Teilnahme am Laboratory Course in
Experimental Diabetes in Gentofte
(Dänemark) bei Ake Lernmark.
- Aug. 1984 2. Teil der Ärztlichen Prüfung
- Sept. 1984 Beginn des Praktischen Jahres:
5 Monate Chirurgie in Südafrika (Jo-
hannesburg; Kapstadt); Innere Medizin
in der III. Medizinischen Klinik im Klini-
kum Großhadern und als freies Fach Uro-
logie in der Urologischen Universitäts-
klinik in Großhadern.
- Nov. 1985 3. Teil der Ärztlichen Prüfung und
Approbation.
- Dez. 1985 Wehrdienst als Stabsarzt im Institut für
Pharmakologie und Toxikologie der Sani-
tätsakademie der Bundeswehr

